

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Superovulation chez les brebis Texel

Tamigniau, Daniel

*Award date:*  
2004

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



---

FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX  
NAMUR

Faculté des Sciences

SUPEROVULATION CHEZ LA BREBIS TEXEL

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
licencié en Sciences biologiques

**Daniel TAMIGNIAU**

**Juin 2004**

Je tiens à remercier les nombreuses personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Merci au Dr. J.-L. Bister pour son suivi permanent, sa patience et ses réponses à mes nombreuses questions sans lesquelles il m'aurait été impossible de mener ce travail à bien.

Merci également au Professeur R. Paquay pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et permis d'y travailler pendant ces quelques mois.

Merci à tout les autres membres du laboratoire de Physiologie Animale.

Merci aux membres du CISO pour leur accueil et leur aide au centre de Faulx-Les-Tombes.

Merci enfin à tous ceux qui de près ou de loin m'ont soutenu dans ce travail.

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix  
FACULTE DES SCIENCES  
Secrétariat du département de Biologie  
Rue de Bruxelles 61- 5000 Namur  
Téléphone : +32(0)81.72.44.18 – Téléfax : +32(0)81.72.44.20  
E-mail : joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

## Superovulation chez la brebis Texel

TAMIGNIAU Daniel

### Résumé

Dans le but d'optimiser les techniques de superovulation chez la brebis Texel, race de moutons la plus répandue dans notre pays, trois expériences ont été réalisées dans le cadre de ce travail. La première expérience s'est déroulée au mois de janvier qui correspond à la fin de la saison de reproduction, la deuxième s'est déroulée au mois de mars, en début d'anoestrus, et la troisième a eu lieu au mois de mai, période de l'année durant laquelle toutes les brebis sont en anoestrus profond.

Ces travaux ont consisté à comparer différents modes et taux d'administration d'un agoniste de la GnRH, la Buséréline et d'observer les résultats sur la population folliculaire à différents moments de l'expérience, les taux plasmatiques de FSH et de LH, et le taux d'ovulation.

Il a été retiré de ces expériences que la brebis Texel a besoin d'une dose d'au moins 100 µg de Buséréline administrée par des mini pompes osmotiques durant 14 jours pour observer un effet drastique sur les sécrétions de FSH et de LH et un blocage de la croissance folliculaire terminale. Les ovaires ne possèdent alors plus aucun gros follicules mais un nombre important de petits follicules recrutables. Cependant, l'administration de gonadotrophines exogènes n'a pas permis dans ce cas d'obtenir un taux d'ovulation supérieur par rapport à d'autres traitements. Les raisons de ce manque d'efficacité de la stimulation gonadotrope sur la maturation folliculaire et lutéale sont discutées en fonction de la saison, de la répétition des traitements qui peut engendrer la formation d'anticorps contre les gonadotrophines d'origine porcine et en fonction d'un éventuel effet inhibiteur de la Buséréline sur la réponse folliculaire aux hormones gonadotropes.

Mémoire de licence en Sciences biologiques  
Juin 2004  
Promoteur : J.-L. Bister

TABLE DES MATIERES	
- INTRODUCTION	1
- REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	3
<u>Chapitre I : Folliculogenèse et cycle sexuel</u>	3
I.1. Ovogenèse et folliculogenèse	3
a) Evolution morphologique	3
b) Evolution temporelle	4
I.2. L'ovulation	5
<u>Chapitre II : La superovulation</u>	7
II.1. Principe	7
II.2. Le contrôle du moment de l'ovulation	7
II.3. Le contrôle du nombre d'ovulations	8
3.1. Stimulation par les hormones gonadotropes	8
3.2. Immunisation	11
3.3. Blocage de l'hypophyse	12
3.4. Stimulation par l'hormone de croissance	14
3.5. La superovulation au Laboratoire de Physiologie animale des FUNDP	14
3.6. Répétition des traitements de superovulation	15
3.7. Diagnostic	15
<u>Chapitre III : La fécondation</u>	16
III.1. Généralités	16
III.2. Fécondation in vivo	16
<u>Chapitre IV : La collecte et le transfert des embryons</u>	18
IV.1. Développement embryonnaire et collecte	18
IV.3. Les méthodes de récolte des embryons	19
IV.3. Recherche et estimation de la qualité des embryons	20
IV.4. La préparation des receveuses	20
IV.5. La transplantation embryonnaire	21
- OBJECTIFS DU MEMOIRE	23
- MATERIEL ET METHODES	24
1. <u>Les animaux</u>	24
2. <u>Les produits utilisés</u>	24
3. <u>Techniques</u>	25
3.1. La laparoscopie	25
3.2. La collecte chirurgicale	25

3.3. La collecte par endoscopie	26
3.4. La synchronisation des receveuses	27
3.5. Dosages hormonaux	27
4. <u>Plan expérimental</u>	30
4.1. Première expérience	30
4.2. Deuxième expérience	31
4.3. Troisième expérience	32
- RESULTATS ET ANALYSES	34
1. <u>Première expérience</u>	34
1.1. Rappel	34
1.2. Le blocage hypophysaire	34
1.3. La stimulation ovarienne	37
1.4. La collecte et le transfert embryonnaires	39
1.5. Conclusions partielles	39
2. <u>Deuxième expérience</u>	40
2.1. Rappel	40
2.2. Le blocage hypophysaire	40
2.3. La stimulation ovarienne	43
2.4. Conclusions partielles	45
3. <u>Troisième expérience</u>	46
3.1. Rappels	46
3.2. Le blocage hypophysaire	46
3.3. La stimulation ovarienne	49
3.4. L'insémination, la collecte et le transfert des embryons	52
3.5. Conclusions partielles	52
- DISCUSSION	54
1. Etat des ovaires avant traitement	54
2. Blocage hypophysaire	55
3. La stimulation ovarienne	56
4. La régression lutéale prématurée	58
5. La collecte et le transfert embryonnaire	59
- CONCLUSION ET PERSPECTIVES	60

## INTRODUCTION

En raison de sa complexité et de son coût, le transfert d'embryons ne saurait prétendre remplacer l'insémination artificielle comme technique de reproduction de routine. En effet, 850 000 brebis et 75 000 chèvres sont inséminées alors que seulement une centaine de femelles de chaque espèce sont concernées par la collecte d'embryons en France chaque année. Cependant, utilisé à partir des embryons de géniteurs soigneusement choisis, le transfert d'embryons permet un progrès génétique supplémentaire non négligeable (*Colleau et al*, 1998) et peut servir à des objectifs commerciaux ou sanitaires. Pour tous les échanges de gènes, la voie du transfert embryonnaire est plus économique que le déplacement d'animaux vivants, et surtout très sécurisante sur le plan sanitaire. L'embryon transféré au stade morula ou blastocyste bénéficie d'une protection naturelle contre les agents infectieux constituée par la zone pellucide. Les lavages successifs effectués selon les recommandations de l'IETS (*Stringfellow et Seidel*, 1990) permettent de réduire fortement le risque de transmission d'agents infectieux.

L'induction d'ovulations multiples et la transplantation embryonnaire (MOET) nécessitent la stimulation hormonale des femelles donneuses pour produire des embryons *in vivo*. Ce mode de production a initié le développement de la technologie du transfert d'embryons, mais récemment est apparue la production d'embryons en culture après maturation et fécondation *in vitro* d'ovocytes prélevés sur l'animal vivant. Les connaissances acquises ces dernières années sur la croissance folliculaire, la maturation ovocytaire, la fécondation et le développement de l'embryon ont été enrichies par le développement des techniques de biologie moléculaire (*Thibault et Levasseur*, 2001). Ces connaissances nouvelles ont contribué d'une part, à simplifier et à rendre davantage opérationnelle cette technique chez les petits ruminants pour qu'elle trouve sa place demain dans les élevages comme c'est le cas aujourd'hui chez les bovins, et d'autre part, à proposer des alternatives de production d'embryons *in vitro* pour faciliter la mise en place des nouvelles biotechnologies.

Nous allons dans le cadre de ce mémoire nous concentrer uniquement sur la production d'embryons *in vivo*. Un cycle de transplantation consiste en une série d'étapes techniques conduisant de  $x$  donneuses traitées à  $y$  produits vivants nés après transfert. Une femelle donneuse pourra, afin d'en accroître encore la descendance, être soumise à plusieurs cycles successifs de production d'embryons. Les femelles donneuses choisies pour leur haut intérêt génétique reçoivent un traitement de synchronisation de l'œstrus et de stimulation ovarienne induisant l'ovulation synchrone d'un nombre d'ovocytes nettement supérieur aux possibilités naturelles. La fécondation de ces ovocytes est alors obtenue par insémination artificielle à l'aide de semences issues de mâles de haute valeur génétique. Les embryons sont prélevés précocement par voie chirurgicale ou sous contrôle endoscopique et peuvent être transférés chez une femelle receveuse sans valeur génétique mais présentant des qualités maternelles reconnues, soit directement soit après une étape de cryoconservation. Le cycle sexuel des receveuses est préalablement synchronisé par un traitement hormonal de manière à fournir aux embryons transférés un environnement utérin adapté à leur stade de développement.

La production d'un nombre important d'embryons suppose que les étapes successives de la stimulation ovarienne, de la fécondation, de la collecte de ces embryons et de la possibilité de répéter plusieurs fois ces opérations chez la même donneuse soient maîtrisées.

Ce mémoire se penchera plus particulièrement sur la production d'ovocytes par la mise au point de différentes techniques de superovulation chez la brebis *Texel* et des processus physiologiques qui accompagnent son induction. L'insémination artificielle et le transfert proprement dit seront aussi abordés, mais dans une moindre mesure.



## Revue bibliographique

### I.1. Ovogenèse et folliculogenèse

La gamétogenèse se déroule en deux phases :

- *L'ovogenèse* est la période durant laquelle se constitue le stock de cellules germinales et de follicules. Chez la brebis, cette étape se déroule uniquement au cours de la vie fœtale et s'achève environ un mois avant la naissance. Le nombre de follicules primordiaux à ce moment est estimé à +/- 400 000.
- *La folliculogenèse* se définit comme étant la succession des étapes du développement des follicules. Elle est initiée dès la vie fœtale et se poursuit sans interruption jusqu'à la mort de la brebis (*Driancourt et al.*, 1991).

#### a) Evolution morphologique

L'ovaire renferme des follicules à différents stades de développement. On distinguera classiquement, suivant l'évolution de la folliculogenèse, les follicules primordiaux, primaires, secondaires, tertiaires et antraux.

Les *follicules primordiaux* sont composés d'un ovocyte entouré de quelques cellules folliculaires.

Les *follicules primaires* correspondent au premier stade du réveil et du développement des follicules ; l'ovocyte augmente de volume et les cellules folliculeuses présentent un aspect cubique.

Dans les *follicules secondaires*, l'ovocyte atteint sa taille maximale et s'entoure de la membrane pellucide qui le sépare d'une granulosa de plusieurs couches de cellules.

Les *follicules tertiaires* se caractérisent par deux couches de cellules autour de la granulosa: la thèque interne et la thèque externe, qui se différencient à partir des cellules somatiques.

Dans le stade suivant, il y a formation au sein de la granulosa d'une cavité, l'antrum, qui contient le liquide folliculaire excrété par les cellules granuleuses et la thèque interne. Ceci constitue le stade ultime de la croissance folliculaire. Le follicule est alors appelé *follicule antral* ou *follicule de De Graaf*. Ce sont les follicules les plus volumineux, présentant un diamètre de 1 à 10 mm.

Le follicule antral peut évoluer en follicule ovulatoire. Il est caractérisé par une reprise de la méiose de l'ovocyte qui se détache de la granulosa avec son cumulus et flotte dans le liquide folliculaire. Au moment de la rupture du follicule, le liquide folliculaire se répand dans la cavité péritonéale et l'ovule est capté par le pavillon de l'oviducte. Libéré de son ovule, le follicule se collapse, est envahi par un petit caillot de sang et évolue en corps jaune.

Les cellules de la granulosa et de la thèque interne se transforment en cellules lutéiniques, se multiplient et forment le corps jaune. S'il n'y a pas de fécondation, le corps jaune entrera en régression au bout de 12 à 13 jours. La trace de sa présence reste souvent plusieurs mois et porte le nom de *corpus albicans*. S'il y a fécondation, le corps jaune est dit

gestatif: il perdure en gardant la même structure et continue à sécréter de la progestérone (P4) (*Bister, 2002*).

## b) Evolution temporelle

### *-Folliculogenèse primordiale et croissance folliculaire basale :*

Le stock de follicules primordiaux constitué durant la vie embryonnaire diminue progressivement par atresie ou au contraire par évolution. Le développement folliculaire se déroule en trois phases :

- la croissance basale
- le développement terminal
- la maturation et l'ovulation

Régulièrement, plusieurs follicules entrent en phase de développement. Certains pourront entamer la phase terminale, les autres entreront en atresie.

Le développement basal ou croissance folliculaire basale (CFB) dure 5 à 6 mois et permet le passage du stade primordial au stade antral jusqu'à un diamètre de 1 à 2 mm (*Driancourt et al., 1991; Leclercq, 1994*).

Les facteurs initiateurs de cette croissance folliculaire basale sont encore aujourd'hui mal connus. Les gonadotrophines ne seraient pas impliquées dans le contrôle du développement basal des follicules (*Fry et al., 1987; Cognié, 1988*) bien que l'indépendance stricte de la folliculogenèse basale envers l'axe hypothalamo-hypophysaire soit parfois mise en doute (*Driancourt et al., 1991*). Scaramuzzi a montré que les follicules préantraux possèdent des récepteurs à LH sur les cellules de la thèque, et des récepteurs à FSH sur les cellules de la granulosa (*Scaramuzzi et al., 1993*).

Comme les gonadotrophines ne sont que peu ou pas impliquées dans la croissance des follicules à ce stade, on peut supposer que la régulation du développement folliculaire basal se fait via un phénomène endogène à l'ovaire. La phase initiale serait essentiellement sous la dépendance de facteurs de croissance paracrines, internes à l'ovaire, mais certaines hormones comme la GH (ou l'IGF1) semblent impliquées (*Bister et al., 1994; Perrad et al., 1996*).

A la fin de cette phase de croissance, les follicules qui sont au stade antral acquièrent des récepteurs LH et FSH en quantités importantes et deviennent sensibles aux gonadotrophines.

### *-Folliculogenèse terminale :*

Tous les petits follicules antraux (1 à 3 mm de diamètre) vont former le réservoir à partir duquel va s'opérer le recrutement, première étape de la croissance folliculaire terminale (CFT); à tout moment du cycle et de la vie sexuelle de la femelle, des follicules recrutés présentent une période de développement rapide.

Au cours de ces phases de croissance, les follicules sont les uns après les autres réduits à l'atresie. Ce phénomène est appelé sélection, les follicules poursuivant leur développement étant les follicules dominants. Cette phase de recrutement s'effectue sous forme de vagues

successives ; au cours d'un même cycle, on en compte trois de 5-6 jours chez la brebis (*Bister et al., 1983; Noël et al., 1996; Mandiki et al., 1997*), 3 de 7 jours chez la chèvre et la vache.

Le recrutement est donc le début du développement rapide de plusieurs follicules antraux simultanément qui vont entamer le processus de croissance terminale lors d'une élévation du taux plasmatique de FSH.

Les recrutements ont lieu les jours 0-1, 6-7, et 12-13 du cycle (le jour 0 étant celui de l'ovulation), périodes qui correspondent à des augmentations des taux de FSH.

Les follicules dominants sécrètent une grande quantité d'œstradiol (E2) et induisent l'atrésie des autres follicules par libération de molécules paracrines ; ils ont un diamètre d'au moins 4 mm et leur chance d'évoluer vers l'atrésie diminue fortement (*Fortune, 1994*).

L'E2 est une hormone qui présente un effet paracrine important et stimule la croissance du follicule qui la produit.

Deux des trois phases de croissance (recrutement, dominance et sélection) se déroulent pendant la phase d'activité du corps jaune. Les sécrétions d'œstradiol ne sont alors pas capables d'induire la décharge de FSH et de LH par rétroaction positive car l'hypothalamus est bloqué par les sécrétions de progestérone du corps jaune. Les deux premières phases ne permettent donc pas aux follicules dominants d'entrer en phase d'ovulation.

A l'opposé, la troisième phase se déroule après lutéolyse, période durant laquelle les taux plasmatiques de progestérone sont faibles. La sécrétion d'œstradiol induit la vague de décharge pré-ovulatoire de GnRH et de LH qui déclenche la maturation finale et l'ovulation du ou des follicules dominants.

On estime que sur les centaines de milliers de follicules primordiaux présents, plusieurs milliers atteignent un développement important mais seulement 100 à 200 ovulent. Les raisons de ce gaspillage apparent, de cette superproduction de follicules qui se poursuit de manière continue durant toute la vie sexuelle de la femelle ne sont pas toutes élucidées, mais une des raisons est probablement que ces follicules en croissance sont responsables du maintien d'un niveau de base en hormones sexuelles. Peut-être s'agit-il aussi en partie d'un atavisme qui rappelle le très grand nombre d'œufs pondus par les espèces les moins évoluées.

## 1.2. L'ovulation

Au terme de la phase lutéale, la PGF2 $\alpha$  sécrétée par l'utérus sous l'influence de l'E2 produit par les gros follicules de la deuxième vague de CFT induit chez la femelle non gestante la régression du corps jaune ou lutéolyse.

La chute de la concentration en progestérone P4 qui reflète la lutéolyse provoque une diminution de l'inhibition de l'axe hypothalamo-hypophysaire. Plusieurs petits follicules antraux dont le diamètre est de 2 à 3 mm entrent alors en phase de croissance terminale. Seuls 2 à 3 d'entre eux atteignent le stade pré-ovulatoire, les autres subissent l'atrésie folliculaire.

Au cours de cette période, la FSH sécrétée par l'hypophyse stimule la croissance folliculaire et engendre une production croissante d'œstradiol (E2). Cette augmentation d'E2

induit chez la femelle le comportement d'oestrus et exerce un rétrocontrôle positif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire, favorisant la production de GnRH.

Cette augmentation de GnRH engendre une sécrétion accrue de FSH et de LH par l'hypophyse pour finalement aboutir à une décharge maximale qui va provoquer l'ovulation, le pic ovulatoire. L'intervalle entre le début de l'oestrus et le pic de LH varie selon l'espèce et la race. L'ovulation se produit 20 à 26 heures après le pic de LH chez la brebis.

Ayant libéré l'ovocyte, le follicule se transforme en corps jaune et commence à sécréter de la P4. Le taux de progestérone reste élevé durant 12 à 14 jours qui constituent la phase lutéale. La P4 exerce un rétrocontrôle négatif sur le complexe hypothalamo-hypophysaire, bloquant ainsi toute sécrétion de GnRH de type préovulatoire..., et le cycle sexuel se poursuit

### II.1. Principe

Les différentes techniques de superovulation ont pour but d'obtenir un maximum d'ovules matures au moment de l'ovulation au lieu d'un ou deux comme lors d'un cycle normal. Ces ovules pourront alors, après fécondation et récolte, être transférés dans différentes femelles receveuses. La femelle traitée pourra donc être à l'origine d'un nombre important de descendants.

### II.2. Le contrôle du moment de l'ovulation

La période de reproduction chez les petits ruminants dépend de la photopériode. En général, les accouplements ont lieu durant la période des jours décroissants, plus particulièrement durant l'automne. Si l'on veut produire des embryons à n'importe quel moment choisi de l'année, il est donc primordial de contrôler le moment de l'oestrus afin d'optimiser la superovulation même en dehors des périodes naturelles d'oestrus et de connaître le moment idéal pour l'insémination.

Pour les receveuses, cette méthode a pour but de faire coïncider leur stade physiologique avec celui de l'âge des embryons à transférer, condition d'une bonne reprise de leur développement après transplantation.

Dans le cadre de la superovulation, le contrôle du moment de l'oestrus est basé sur des techniques hormonales.

- *Administration de progestérone (P4)*

La P4 exogène joue le rôle de corps jaune artificiel. Elle inhibe les décharges préovulatoires de GnRH, et donc de FSH et de LH, et de ce fait bloque l'ovulation. Lors de l'arrêt du traitement, la chute du taux de P4 est rapide et permet un feed-back positif des oestrogènes sur l'axe hypothalamo-hypophysaire. La maturation finale est amorcée et l'ovulation se déroule 50 à 70 heures plus tard (*Walker et al., 1989*)

L'administration peut se faire de différentes manières :

- Par injection : l'injection quotidienne de 12 mg de progestérone par voie intramusculaire durant 17 à 21 jours a été utilisée avec succès chez la chèvre (*Tervit et al., 1984*). D'un point de vue pratique, l'utilisation de cette méthode est contraignante.
- Implants vaginaux : les éponges vaginales de polyuréthane, imprégnées de 60 mg d'acétate de médroxy-progestérone (M.A.P.) ou de 30 à 45 mg d'acétate de fluorogestone (F.G.A.), sont le support de progestagène le plus couramment utilisé. La pose de ces éponges est effectuée à l'aide d'un applicateur adapté.
- Implants sous-cutanés : le traitement progestatif peut aussi être réalisé à l'aide d'implants sous-cutanés imprégnés de 3 mg de Norgestomet qui sont insérés sous la peau au niveau de la surface externe de l'oreille. L'efficacité de cette voie d'administration du progestagène est égale à celle des éponges vaginales (*Bretzlaff et Madrid, 1989*).

La durée recommandée du traitement progestatif est proche de la durée de la phase lutéale, soit 10 à 14 jours.

- *Administration de prostaglandines*

La synchronisation des oestrus peut aussi être obtenue sans réaliser d'imprégnation par un progestagène, mais en induisant une lutéolyse synchrone au moyen de deux injections d'un analogue de la prostaglandine PGF2 $\alpha$ .

La nécessité de procéder à 2 injections espacées de 10 à 14 jours est imposée par le fait que d'une part les femelles en phase folliculaire ne sont pas sensibles (elles n'ont en effet pas de corps jaune), et que d'autre part les corps jaunes ne deviennent sensibles à la prostaglandine qu'à partir du 5<sup>ème</sup> jour de la phase lutéale. Une part plus ou moins importante des femelles n'est donc pas synchronisée par une injection isolée de prostaglandine.

Une limitation évidente à l'utilisation de cette méthode est son inefficacité totale sur des femelles non cycliques, par exemple en dehors de la saison sexuelle (*Baril et al., 1993*).

### II.3. Le contrôle du nombre d'ovulations

#### 3.1. Stimulation par les hormones gonadotropes.

Les hormones gonadotropes sont des hormones produites par l'hypophyse ou le placenta et qui, une fois libérées, vont atteindre et stimuler les gonades. Ce sont des glycoprotéines dont la teneur en acide sialique conditionne leur résistance à la dégradation par le foie, et donc leur demi-vie dans le sang (*Baril et al, 1993*).

Il existe une diversité d'hormones gonadotropes permettant un traitement superovulatoire : eCG, FSH, LH, hMG... Les hormones gonadotropes les plus utilisées actuellement pour la superovulation chez les ruminants sont l'eCG, la FSH et la LH (*Brebion et al, 1992*).

- *La eCG*

Egalement appelée PMSG (gonadotrophine sérique de jument gestante), la eCG (equine chorionic gonadotrophin) est la première gonadotrophine à avoir été utilisée pour obtenir une superovulation, administrée par voie intramusculaire en une seule injection de 1000 à 2000 UI un ou deux jours avant le retrait de l'éponge (*Cognié et al, 2002*). La eCG (gonadotrophine chorionique équine) est une hormone proche de la LH synthétisée par le placenta de jument. Cette hormone est riche en acide sialique et a de ce fait une demi-vie assez importante qui est de plus ou moins 26 heures (*Cole, 1975*).

Injectée chez d'autres espèces, elle présente un effet FSH et induit la croissance des follicules (*Bister, 2003*). Elle permet aux follicules de répondre à la LH en ovulant (*Schwartz, 1973*). La dose administrée doit être adaptée en fonction de l'espèce, de l'environnement et du but poursuivi (augmentation de la prolificité de la brebis ou prélèvement d'embryons).

Cependant, cette gonadotrophine présente deux inconvénients : d'une part, la forte activité LH de la eCG peut induire une activation prématurée de la méiose ovocytaire, et d'autre part, son action prolongée due à sa longue demi-vie provoque des modifications des événements endocriniens défavorables au transport des gamètes dans les voies génitales. Ces effets

conjugués peuvent expliquer les faibles performances obtenues avec de l'eCG (2 à 3 embryons transférables en moyenne par donneuse) et son abandon au profit de FSH, obtenue à partir d'extraits hypophysaires (*Cognié et Baril, 2002*).

L'eCG ou PMSG est d'usage très courant dans la reproduction contrôlée des petits ruminants et est commercialisée en Belgique et en France sous le nom de Folligon®.

- *La hCG :*

La hCG ou hormone gonadotrope chorionique humaine est une glycoprotéine produite par les tissus trophoblastiques du placenta humain et est constituée de deux chaînes polypeptidiques attachées à un hydrate de carbone (*Goldstein, 1979*). Sa richesse sialique lui confère une demi-vie beaucoup plus importante que les hormones hypophysaires (*Bister, 2001*). La demi-vie de la hCG est d'environ 40 heures.

Sa production durant la gestation fournit le stimulus hormonal pour la production de progestérone, elle peut prolonger l'existence du corps jaune et assure ainsi la sécrétion de progestérone ovarienne jusqu'à ce que le placenta puisse la sécréter (*Goldstein, 1979*).

La hCG présente surtout une activité LH (*Schwartz, 1973*). Injectée au moment du pic de LH, elle double la stimulation de LH endogène et peut augmenter la qualité de l'ovulation. Elle entraîne une légère amélioration de la fécondité (*Bister, 2003*). Des études ont cependant montré qu'une injection de hCG peut entraîner une diminution des réponses de superovulation (*Barrier-Battut et al, 2001*).

La hCG est commercialisée sous différents noms, notamment Pregnyl®.

- *La hMG :*

La hMG est l'hormone gonadotrope ménopausale humaine. Elle est produite par l'hypophyse lors de la ménopause et est très semblable à la FSH (*Bister, 2003*). Surtout employée chez la femme, elle est commercialisée sous l'appellation de Néopergonal® ou de Humégon®.

L'injection de cette hormone lors d'un traitement de superovulation accroît l'activité mitotique des follicules et de ce fait stimule leur croissance. Elle doit pour ce faire être injectée en fin de phase lutéale ou en début de phase folliculaire (*Gougeon et al., 1984*).

Cette hormone engendre aussi un pourcentage de follicules 2-5 mm sains supérieur à celui observé au niveau d'ovaires non stimulés et permet donc la sélection de plusieurs follicules de 2 à 5 mm qui pourront se développer et maturer de façon adéquate (*Hodgen et al, 1984*).

On peut en conclure que la hMG renforce la capacité de développement des follicules en stimulant leur activité mitotique et, de cette façon, leur vitesse de croissance (*Gougeon et al., 1984*).



- *La FSH et la LH*

La LH et la FSH sont les hormones gonadotropes qui seront employées dans la partie pratique de ce travail.

Elles sont synthétisées au niveau de l'adénohypophyse. Leur libération se fait sous le contrôle de la GnRH, de l'inhibine et sous influence du niveau d'hormones stéroïdiennes circulantes.

Ces hormones jouent des rôles importants pour la maturation folliculaire et l'ovulation.

La LH, à des concentrations très importantes (lors du pic pré-ovulatoire), induit la transformation des cellules de la thèque et de la granulosa en un corps jaune qui sécrète la progestérone.

Durant la période précédant l'oestrus, des niveaux de LH légèrement élevés permettent le maintien de la concentration en oestradiol (*Schwartz et Ely, 1974*). La LH intervient également au niveau du follicule arrivé au voisinage de la maturité : elle agit en synergie avec la FSH pour provoquer la rupture du follicule. L'ovocyte est alors expulsé et les cellules folliculaires sont transformées en corps jaune (*Racadot et al, 1972*).

Le pic de FSH, lui, est nécessaire à la maturation des follicules autres que ceux qui ovulent au moment de ce pic (*Schwartz et Ely, 1974*). Il stimule le recrutement et la croissance des follicules de la première vague du cycle par prolifération des cellules folliculaires et développement de l'antrum (*Racadot et al, 1972*). Enfin, à la fois chez le mâle et la femelle, la FSH permet le développement des gamètes et la sécrétion d'hormones par les gonades (*Brown, 1994*).

Chez la brebis, l'augmentation de la fréquence des pulses de LH durant la phase folliculaire induit la maturation finale des follicules ovulatoires, incluant l'augmentation de la production d'oestradiol et l'augmentation des récepteurs à LH au niveau de la thèque et de la granulosa. Ce processus de maturation finale assure l'ovulation du follicule en réponse au pic pré-ovulatoire d'hormones gonadotropes, en dépit de la faible régulation du nombre de récepteurs à LH et de l'inhibition de la production d'oestradiol qui a lieu durant le pic pré-ovulatoire de LH (*Webb et Gauld, 1984*).

Lors d'un traitement de superovulation, des extraits hypophysaires porcins (pFSH et pLH) ou ovins (oFSH et oLH) sont administrés de façon séquentielle (6 à 8 injections à 12 heures d'intervalle les 3 ou 4 derniers jours du traitement progestagène, la dernière injecton ayant lieu 12 heures après le retrait du progestagène) étant donné leur courte demi-vie (quelques heures) (*Cognié et Baril, 2002*). Des extraits purifiés de oFSH et de pFSH sont disponibles sur le marché. En ce qui concerne la pFSH, elle est administrée en doses décroissantes et est enrichie en pLH (FSH/LH de 0.3 à 0.4) lors des deux dernières injectons réalisées à l'arrêt du traitement progestagène et 12 heures au plus tard (*Baril et al, 1993*). *Gonzalez-Bulnes et al (2002)* ont confirmé dans des études récentes le bien-fondé de cette méthode des doses décroissantes de FSH.

Notons qu'un traitement « cocktail » associant en une seule injection la FSH avec une dose modérée de eCG (400 à 800 UI) a été utilisé avec succès chez la brebis Mérimos australienne afin d'éviter les désavantages liés à la durée d'activité biologique de chacune des gonadotrophines (*Ryan et al, 1991*).

### 3.2.Immunisation

L'immunisation active ou passive contre différentes hormones est une approche qui consiste à augmenter la concentration des gonadotrophines endogènes chez la femelle donneuse, en limitant la rétroaction négative de l'ovaire sur le système hypothalamo-hypophysaire par immunisation active contre l'androstènedione ou contre l'inhibine. L'immunisation permet d'augmenter le taux d'ovulation, mais celui-ci restera cependant toujours dans des proportions physiologiques, sans relation avec les niveaux recherchés en transfert d'embryons (*Bister, 2003*).

- *L'inhibine*

L'inhibine est une hormone produite par les cellules de la granulosa des follicules ovariens. Elle est constituée de deux sous-unités liées par des ponts disulfures et a un poids moléculaire approximatif de 32 000 Da. Elle contrôle la sécrétion de FSH en exerçant un rétrocontrôle négatif sur l'hypothalamus et l'hypophyse. Des travaux ont montré que, si l'on dispose de brebis immunisées avec la sous-unité  $\alpha$  de l'inhibine recombinante humaine et d'un groupe contrôle, le taux d'ovulation avant la synchronisation est environ quatre fois plus élevé chez les brebis immunisées. Après synchronisation, le taux d'ovulation est plus ou moins 1,5 fois plus important chez les brebis immunisées (*Mizumachi et al, 1990*).

L'immunisation contre cette hormone engendre donc une augmentation de la teneur plasmatique en FSH. La teneur en LH est aussi plus importante. Il en résulte une augmentation du taux d'ovulation (*Bister, 2003*).

L'inhibine humaine a donc un pouvoir immunogène, ses anticorps suppriment les effets de l'inhibine endogène et jouent le rôle de facteur de régulation dans le contrôle du taux d'ovulation (*Mizumachi et al, 1990*).

- *Les stéroïdes endogènes :*

Les stéroïdes endogènes peuvent également constituer la cible d'une immunisation. Si on immunise contre les oestrogènes ou la progestérone, bien que le taux d'ovulation soit augmenté, le cycle est perturbé. Il est donc préférable de trouver une autre cible. L'injection de  $\Delta 4$ -androstènedione liée à de l'albumine sérique humaine provoque une réaction immunitaire contre l'androstènedione. Or, celle-ci facilite l'atrésie des follicules. Son inactivation permet donc la survie de follicules supplémentaires jusqu'à l'ovulation. Parallèlement, la teneur plasmatique en oestradiol diminue, ce qui réduit le rétrocontrôle négatif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire et augmente les niveaux de FSH et de LH dans le sang (*Bister et al, 1988; Derycke et al, 1988; Bister et al, 1988*).

Cette approche, qui permet d'augmenter le taux d'ovulation et la prolificité des femelles immunisées, ne diminue pas le principal problème qu'est la variabilité de la réponse au traitement de superovulation et n'a pas été poursuivie (*Cognié et Baril, 2002*).

### 3.3 Blocage de l'hypophyse

L'hypophyse peut-être bloquée de deux manières principales, par une overdose d'agonistes de la GnRH ou au contraire par des antagonistes de celle-ci.

- *Agonistes de la GnRH*

La séquence de la GnRH est (*Zhu et al, 2002*) :

Pglu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>

Il s'agit d'un décapeptide dont la demi-vie est très courte (4 à 5 minutes) et l'action localisée au niveau de l'hypophyse (*Baril et al, 1993*).

L'agoniste synthétique de la GnRH le plus connu est la Buséréline, employée dans ce travail, et dont la formule est très proche de celle de la GnRH :

Pglu-His-Trp-Ser-Tyr-**Ser**-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>.

La Buséréline est une substance qui accélère l'ovulation en l'induisant 24 à 48 heures après le début du traitement.

Elle provoque une augmentation de la concentration en LH durant une période de 48 heures. Ces résultats ne sont pas accompagnés d'une altération de la fertilité. La Buséréline peut donc être utilisée comme un substituant de hCG pour induire l'ovulation (*Barrier-Battut et al, 2001*). Les expériences de *Newcombe et al* en 2001 ont démontré que la Buséréline permet d'augmenter le taux de gestation de 10 % chez le cheval.

Mais une autre utilisation des agonistes de la GnRH consiste à réaliser une « hypophysectomie chimique » et donc de supprimer ou au moins de diminuer les sécrétions de gonadotrophines hypophysaires. En effet, la GnRH d'origine hypothalamique n'exerce d'action stimulante sur l'hypophyse que grâce à son mode de sécrétion pulsatile. Son administration continue aboutit à un effet de saturation des récepteurs hypophysaires. On obtient ainsi une désensibilisation hypophysaire dont l'expression est le blocage de la sécrétion de LH et de FSH.

Les agonistes de la GnRH, dérivés de synthèse par substitution d'un acide aminé dans la chaîne du décapeptide, exercent les mêmes propriétés que la GnRH elle-même, mais ont l'avantage d'avoir une demi-vie plus longue. L'effet de désensibilisation hypophysaire peut donc être plus facilement obtenu (*Hedon et al, 1986*).

Cette inhibition des sécrétions endogènes de FSH et de LH permet d'accroître le nombre de follicules dans la classe de taille qui précède la dépendance de ces follicules vis-à-vis des gonadotrophines (1 à 2 mm).

Après ce traitement (Buséréline-40µg/jour) administré pendant deux semaines, le nombre de follicules dans la classe 1-2 mm est doublé, le taux d'atrésie folliculaire est significativement diminué dans cette classe de taille et la réponse au traitement de superovulation est augmentée de 50 % (*Brebion et al, 1992*).

Chez la femme, l'agoniste Buséréline peut-être administré aussi bien par voie sous-cutanée que par voie intra-nasale. Par voie intra-nasale, il n'y a que 2,5 à 6 % de la quantité administrée qui parvient intacte dans la circulation systémique (*Holland et al, 1986*).

L'injection sous-cutanée de 50 µg trois fois par jour déprime d'une façon effective les gonadotrophines et empêche la montée spontanée des taux de LH. Bien que par voie intra-nasale l'absorption soit 20 à 40 fois plus faible, l'administration d'un minimum de cinq fois 100 µg répartis sur la journée est aussi efficace pour un traitement de désensitivation hypophysaire chez des patientes à ovulation normale. Il est cependant nécessaire d'augmenter la dose et la fréquence de l'administration intra-nasale chez des patientes à haut taux de LH endogène (syndrome de Stein-Leventhal; *Smitz et al, 1987*).

Chez la brebis Welsh, des effets de la Buséréline sont significatifs ( $p < 0.005$ ) par une administration de 50 µg par jour grâce à des mini pompes osmotiques (*Mc Neilly et Fraser, 1987*).

*Brebion et Cognié* en 1989 déjà, ont obtenu des résultats très encourageants sur la brebis Lacaune, le nombre de petits follicules passe de 10 à 22 en moyenne et les gros follicules disparaissent de la surface ovarienne; le taux d'ovulation suite à une stimulation FSH-LH passe de 13 à 19 en moyenne.

Sur les mêmes brebis Lacaune, des expériences plus récentes ont montré que 40 µg par jour de Buséréline administrés par des mini pompes osmotiques pendant 2 semaines suffisaient pour inhiber les sécrétions hypophysaires endogènes de FSH et de LH (*Cognié et Baril, 2002*).

- *Antagonistes de la GnRH :*

De nouvelles molécules permettent le blocage de l'hypophyse en empêchant l'action de la GnRH.

Parmi ces substances, il existe l'Antarelix (commercialisé sous le nom Teverelix®). Il s'agit d'une molécule soluble dans l'eau, avantage important par rapport aux antagonistes courants de la GnRH. Cette molécule, en se fixant sur les récepteurs hypophysaires à GnRH, bloque l'effet de l'hormone hypothalamique. Les conséquences sont le retour des taux de LH à un niveau de base dans les 4 heures, son maintien à ce niveau pendant un nombre de jours variable en fonction de la dose administrée et la réduction du taux de FSH à un minimum.

L'Antarelix favorise donc une plus grande réponse superovulatoire en bloquant l'hypophyse, ce qui, tout comme pour la Busérelina, permettra un contrôle de la réponse ovarienne en utilisant des hormones gonadotropes exogènes (*Dufour et al, 2000*).

Appliqué chez la brebis laitière de race Lacaune, un pré-traitement à l'Antarelix de 50 µg/jour permet d'éliminer les faibles réponses (moins de 5 ovulations), assure en moyenne la production de 10 embryons transférables et la naissance de 6 à 7 agneaux par donneuse traitée (*Cognié, 1999*). La variabilité du taux d'ovulation ( $22.3 \pm 7.5$ ) demeure élevée mais comme le nombre d'ovulations chez une même donneuse est hautement répétable avec ce protocole ( $r = 0.76$ ), il est possible que cette variabilité entre donneuses reflète des différences génétiques dans l'aptitude à la superovulation (*Cognié et al, 2000*).

Notons que l'Antarelix provoque toute une série d'effets secondaires chez l'homme et sera donc préférentiellement utilisé chez l'animal. Dans la thérapie humaine, on utilise une molécule proche de l'Antarelix appelée Cetrorelix.

L'Antarelix est également utilisé à d'autres fins comme la suppression de la sécrétion de testostérone chez le mâle, la suppression de LH chez le bélier castré...

### 3.4 Stimulation par l'hormone de croissance

Une autre stratégie, qui a donné des résultats encourageants chez la génisse (*Gong et al, 1995*), consiste à stimuler la synthèse d'IGF1 afin d'augmenter la population de follicules recrutables par administration de somatotrophine (hormone de croissance ou GH) la semaine précédant la stimulation gonadotrope. Cependant, chez les brebis et les chèvres ayant été traitées dans les mêmes conditions avec l'hormone de croissance, la réponse ovarienne après FSH n'a pas été améliorée. Un effet bénéfique de l'hormone de croissance sur la qualité et le nombre d'embryons ovins transférables a été mis en évidence lorsque celle-ci est administrée seulement le jour du retrait du support de progestagène, au moment des deux dernières injections de FSH lors de la croissance folliculaire préovulatoire (*Folch et al, 2001*). Ces auteurs attribuent cet effet bénéfique soit à une action directe sur la maturation ovocytaire soit à une action indirecte à travers l'environnement utérin (*Cognié et Baril, 2002; Perrad et al, 1995*).

### 3.5. La superovulation au Laboratoire de Physiologie animale des FUNDP.

Bien que les recherches sur la superovulation aient donné de très bons résultats sur les brebis Texel du Centre de Recherches Ovines (CRO) de Faulx-les-Tombes, le protocole FSH/LH ayant été gardé au vu de ses excellents résultats, il n'en est pas de même des différentes techniques de pré traitement avant la superovulation.

En 2002, des expériences ont mis en évidence l'absence d'effet de l'Antarelix sur le niveau des hormones gonadotropes, les diminutions brusques des taux plasmatiques de FSH et de LH attendues n'ayant pas été observées.

En 2003, des expériences ont été menées afin d'affiner le protocole lié à l'administration de l'Antarelix ainsi que l'utilisation de Busérelina comme bloquant hypophysaire.

Cette étude avait pour objectif d'étudier l'effet de la Buséréline ou de l'Antarelix sur les taux plasmatiques de FSH et de LH sur des brebis superovulées. Le but était de réduire les sécrétions hypophysaires pour permettre la formation d'un grand pool de follicules ovariens capables d'être recrutés par une stimulation LH-FSH exogène.

Les résultats retirés de ces expériences sont les suivants :

- Les concentrations plasmatiques de LH ont diminué légèrement après traitement à l'Antarelix, mais n'étaient pas significativement plus basses que dans le groupe témoin.
- En ce qui concerne les concentrations plasmatiques de FSH, les brebis traitées avec le Antarelix présentaient des taux moins élevés ( $P < 0.05$ ) que les celles du groupe contrôle. La Buséréline induit quant à elle un large pic de sécrétion ( $P < 0.01$ ) le jour de la pose de la pompe osmotique la contenant, et les brebis traitées avec celle-ci présentaient de faibles taux plasmatiques de FSH, inférieurs à ceux des brebis traitées avec le Antarelix ( $P < 0.05$ ) et à ceux des brebis du groupe contrôle ( $P < 0.01$ ).

Il a donc été conclu suite à ce travail que l'agoniste de la GnRH Buséréline et l'antagoniste de la GnRH Antarelix n'affectent significativement que la sécrétion de FSH (*Bister et al, 2003*).

### 3.6. Répétition des traitements de superovulation

La superovulation répétée jusqu'à 5 fois avec des intervalles de 6 mois à 1 an engendre des réponses totales moyennes satisfaisantes, mais on observe une diminution progressive dans la proportion de brebis superovulées et une chute significative dans le taux d'ovulation moyen, spécialement entre le premier et le second traitement. Malgré ces variations dans le degré des réponses superovulatoires, le nombre d'embryons récupérés par brebis donneuse est très similaire pour un même animal ayant subi plusieurs traitements successifs (*Bari et al, 2001*).

### 3.7. Diagnostic

L'estimation du taux d'ovulation se fait par comptage des corps jaunes. Elle peut être réalisée par échographie transrectale. Cette méthode s'est révélée efficace pour vérifier les résultats de superovulation dans le transfert d'embryons (*Rubianes et Menchaca, 2003*).

L'estimation du taux d'ovulation ainsi que le comptage des follicules ovariens peuvent aussi être réalisés par observation des ovaires par endoscopie. Cette méthode utilise un endoscope et permet d'observer les organes internes. Les follicules des différentes classes de taille ainsi que les corps jaunes sont alors comptés en observant la surface des ovaires.

### III.1. Généralités

Chez le mouton, le dépôt de la semence est effectué dans le vagin par le mâle. La femelle doit pour cela être en période d'oestrus. Les spermatozoïdes passent alors par le cervix et l'utérus avant d'atteindre l'oviducte où la fécondation peut avoir lieu entre l'ovule et un seul spermatozoïde.

La vitesse à laquelle les spermatozoïdes atteignent le site de fécondation dépend non seulement de leur motilité individuelle, mais surtout de la motilité du tractus génital femelle.

Lorsqu'un spermatozoïde pénètre un ovocyte, il induit divers changements dont une modification de la zone pellucide afin d'empêcher la pénétration de plusieurs spermatozoïdes ainsi que la reprise et l'achèvement de la méiose. On observe une fusion des noyaux et l'œuf activé commencera à se diviser 24 heures plus tard (*Baril et al, 1993*).

La fécondation peut-être réalisée in vivo ou in vitro. La fécondation in vitro n'étant pas pratiquée dans ce travail, nous n'allons pas l'aborder ici, disons juste qu'elle permet d'étudier plus en détail la maturation des gamètes, permet la production de jeunes par des femelles stériles et aide au développement de certaines techniques comme le transfert d'embryons. Des mémoires antérieurs, réalisés au laboratoire de Physiologie animale, relatent les essais effectués dans ce domaine.

### III.2. Fécondation in vivo

In vivo, le dépôt de la semence doit être effectué de façon à ce que les spermatozoïdes se trouvent sur le lieu de fécondation au bon moment pour pouvoir pénétrer l'ovule car la durée de vie des gamètes est très courte ; ce paramètre est donc à prendre en compte lors du choix du moment optimum de l'insémination artificielle (*Baril et al, 1993*).

La semence peut être déposée à différents endroits du tractus génital de la femelle à féconder, le dépôt peut être :

- *Vaginal* :

Le sperme est déposé le plus loin possible dans le vagin, si possible à l'entrée du cervix. Il s'agit d'une insémination dite exocervicale. Cette méthode est souvent employée chez la brebis car il est très difficile de traverser le cervix chez cet animal.

Une insémination de ce type nécessite l'administration de 400 millions de spermatozoïdes pour une fertilité maximale. Auparavant, on réalisait généralement deux inséminations espacées de 8 à 12 heures. On observe actuellement que le taux de réussite n'est pas significativement inférieur si on réalise une seule insémination, généralement 54 heures après la fin du traitement progestatif de synchronisation de l'ovulation (*Gordon, 1997*).

- *Utérin transcervical* :

Le sperme est déposé dans l'utérus. Cette technique est réalisée pour des espèces dont le col est facile à franchir, comme la jument (*Bister, 2003*).

Dans ce cas, le taux de conception est plus faible si on utilise du sperme congelé que du sperme frais dilué (*Gordon, 1997*).

Au CRO, la méthode de traversée du col par visualisation des replis au moyen d'un endoscope très fin permettant l'injection d'un liquide est à l'essai chez la brebis.

- *Utérin par endoscopie :*

Les spermatozoïdes sont injectés dans l'utérus à travers la paroi abdominale. Une fibre optique et un pistolet d'insémination terminé par une fine aiguille sont introduits dans l'abdomen de l'animal sous anesthésie locale. Du sperme est injecté dans chacune des deux cornes utérines. Cette technique permet l'utilisation d'un plus petit nombre de spermatozoïdes (2x20 millions chez la brebis) et ceux-ci peuvent-être moins vigoureux puisque directement déposés dans la cavité utérine (*Bister et al, 1989*). Le taux de fertilisation est identique pour du sperme congelé et pour du sperme frais (*Gordon, 1997*). Chez la brebis superovulée, la qualité embryonnaire est maximale si elle subit une insémination intra-utérine avec 100 millions de spermatozoïdes 2 à 6 heures après le début des chaleurs sachant que celles-ci durent en moyenne 20 heures (*Baril et al, 1993*).

- *GIFT :*

Dans le cadre d'une « Gamete Intra Fallopian Transfer », les spermatozoïdes sont injectés dans l'oviducte en pénétrant par le pavillon. Cette méthode est peu utilisée car difficile à réaliser.

- *Intra-folliculaire :*

Les spermatozoïdes sont directement injectés dans le follicule ovarien qui constitue un excellent milieu de capacitation. Cette technique n'est également réalisée qu'à titre expérimental.

- *Intra-péritonéal :*

Le dépôt est effectué dans le cul-de-sac de Douglas via une injection de spermatozoïdes à travers la paroi profonde du vagin (*Bister, 2003*). Cette technique, utilisée avec succès chez la femme, n'a jamais été décrite comme efficace chez la brebis.



#### IV.1. Développement embryonnaire et collecte

Une fois l'ovocyte fécondé, la mitose permet la formation d'un embryon à 2 blastomères environ 24 heures après la fusion des gamètes. Les divisions vont alors se succéder pour donner des cellules de plus en plus petites étant donné que la taille de l'embryon ne varie pas, celui-ci restant enfermé dans sa zone pellucide.

Lorsque le nombre de cellules constituant l'embryon est compris entre 16 et 32, on parle de morula. C'est au stade morula que l'embryon entame sa migration dans l'oviducte vers l'utérus.

On observe ensuite la formation d'une cavité pleine de liquide. L'embryon est à ce stade le blastocyste. Il pénètre dans l'utérus entre le 4<sup>ème</sup> et le 6<sup>ème</sup> jour et subit ensuite toute une série d'expansions qui vont aboutir à la sortie de la zone pellucide. Il s'attache à l'épithélium de la corne utérine au jour 14 de la gestation. Il sécrète diverses substances dont une, appelée trophoblastine en raison de son origine, induit au niveau de l'utérus la synthèse et la sécrétion de PGE2. La PGE2 possède une forte action lutéotrope et est à même de contrecarrer l'action de la PGF2 $\alpha$  produite par l'utérus et qui est responsable de la lutéolyse lors des cycles sans fécondation. La trophoblastine a été identifiée chez les ruminants comme étant l'interféron 2 (IFN<sub>2</sub>).

La récolte des embryons est réalisée en général le 6<sup>ème</sup> ou le 7<sup>ème</sup> jour après l'insémination au jour du début de l'oestrus (jour 0). Cette « fenêtre » de collecte relativement courte est la résultante de plusieurs facteurs :

1. le passage des embryons de l'oviducte dans l'utérus a eu lieu à partir du 4<sup>ème</sup> jour,
2. pour des raisons sanitaires, la législation impose que l'embryon soit transféré avant sa sortie de la zone pellucide qui peut survenir à partir du 8<sup>ème</sup> jour,
3. la congélation des embryons n'est maîtrisée que pour les embryons des stades morula compactée et blastocyste soit les 6<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> jour après le début de l'oestrus.

Chez les ovins, la sortie du blastocyste de la zone pellucide commence à partir du 7<sup>ème</sup> jour, pour cette espèce, il est par conséquent souhaitable de récolter les embryons le 6<sup>ème</sup> jour après le début de l'oestrus. Le tableau 1 montre l'évolution de l'embryon, de l'insémination de la brebis à l'implantation de l'embryon.

Tableau 1 : Développement embryonnaire chez le mouton.

Jour	Stade	Situation	Temps après le début de l'oestrus
0	Début de l'oestrus Pic de LH Insémination		0 Oestrus 0-12
1	Ovulation Fécondation	Oviducte Oviducte	24-30 25-31
2	2 blastomères 4 blastomères	Oviducte Oviducte	56 60
3	8 blastomères	Oviducte	72
4	Morula 16 cellules	Libre dans l'utérus	96
5	Morula 48 cellules	Libre dans l'utérus	
6	Blastocyste 100 cellules	Libre dans l'utérus	
7	Blastocyste 200 cellules	Libre dans l'utérus	
8	Blastocyste 400 cellules sortant de la zone pellucide	Libre dans l'utérus	
9	Blastocyste de 400 cellules sans zone pellucide	Libre dans l'utérus	
10	Blastocyste 700 cellules	Libre dans l'utérus	
14	Implantation		

#### IV.2. Les méthodes de récolte des embryons

En raison de la difficulté de « franchir » le col de l'utérus et de l'impossibilité de manipuler les cornes utérines par palpation rectale comme chez les bovins et équins, la collecte des embryons par les voies génitales naturelles est peu développée chez les petits ruminants. Les embryons sont le plus souvent récoltés par laparotomie abdominale (collecte chirurgicale) ou sous contrôle endoscopique (collecte par endoscopie ou laparoscopie).

La collecte chirurgicale consiste à extérioriser le système reproducteur de la brebis par une incision dans la paroi abdominale et à rincer successivement les deux cornes utérines avec du milieu tamponné chaud. Généralement, le liquide est injecté à la base de la corne près du corps utérin et est recueilli à la jonction utéro-tubaire par un petit cathéter permettant l'écoulement du liquide perfusé dans un tube maintenu au chaud.

La récolte sous contrôle endoscopique est basée sur la même méthode mais réalisée dans l'abdomen grâce à l'observation des viscères par l'endoscope.

Cette seconde méthode est plus difficile à appliquer et le taux d'œufs récoltés par endoscopie est inférieur de 10 à 15 % à celui obtenu par chirurgie mais la répétition de la collecte par endoscopie ne provoque pas de diminution du taux d'œufs collectés (*Mc Kelvey et al, 1986 ; Vallet et al, 1987*).

#### IV.3. Recherche et estimation de la qualité des embryons

Le milieu de collecte récupéré après lavage des cornes utérines est versé dans une boîte de Pétri à fond quadrillé afin de faciliter la recherche des embryons à la loupe binoculaire. On procède en général à un minimum de deux lectures de chaque boîte. Les embryons sont aspirés à l'aide d'une fine pipette de verre et placés dans une boîte de Pétri contenant du PBS. Une fois regroupés et dénombrés, l'opérateur peut procéder au contrôle de leur qualité.

La qualité de l'embryon est en général estimée d'après son aspect morphologique :

- La zone pellucide doit laisser apparaître une parfaite intégrité et être parfaitement sphérique.
- Les embryons présentant un retard de développement supérieur à 48 heures sont éliminés. Un embryon collecté au 6<sup>ème</sup> jour doit normalement avoir atteint le stade morula compactée/blastocyste. Tout embryon présentant 16 cellules ou moins ne sera pas retenu pour la transplantation ou la congélation en raison du retard excessif de son développement.
- Quel que soit son développement, l'embryon lui-même doit être sphérique et les contours des cellules qui le composent parfaitement visibles.

L'embryon peut ensuite être lavé en attendant sa congélation ou son transfert dans une brebis receveuse.

#### IV.4. La préparation des receveuses

Les cycles ovulatoires de la donneuse et de la receveuse doivent être synchronisés afin que la brebis soit prête à recevoir l'embryon au stade auquel il est transféré. La receveuse doit donc se trouver dans les mêmes conditions hormonales et physiologiques que la donneuse afin de pouvoir accueillir les embryons dans l'environnement intra-utérin.

La synchronisation peut être naturelle, mais cela nécessite un grand nombre de receveuses pour que, finalement, seul un petit nombre se révèle être vraiment synchronisé. Elle est donc souvent engendrée de façon artificielle. Généralement, elle est réalisée grâce à un traitement semblable à celui administré aux donneuses, c'est-à-dire par la pose d'éponges de progestérone et l'injection d'hormones gonadotropes (*Armstrong et Evans, 1983*).

La synchronisation doit présenter une marge maximale de 24 heures entre l'état de développement de l'embryon et le jour du cycle de la brebis receveuse afin de pouvoir réaliser un transfert efficace (*Murray, 1978*).

Les brebis receveuses doivent être judicieusement choisies car les facteurs maternels peuvent avoir une influence sur la taille du fœtus. Cette influence est davantage observée lorsque de gros fœtus se développent dans de petites brebis que dans le cas contraire (*Armstrong et Evans, 1983*).

#### IV.5. La transplantation embryonnaire

Après avoir récupéré les embryons obtenus chez les femelles donneuses, ceux-ci seront transférés dans une femelle receveuse. On augmente de cette façon la descendance des meilleures brebis qui seront destinées à produire des embryons sans perdre de temps avec la gestation.

Souvent, le transfert est réalisé avec 2, 3 embryons ou même plus car les chances d'observer une gestation augmentent avec le nombre d'embryons transférés (*Bister, 2003*).

Si on transfère deux embryons frais par laparoscopie à une femelle receveuse bien synchronisée, la fertilité est de 70-80% (*Brebion et al, 1992*).

La brebis est placée en décubitus dorsal, comme pour les opérations de laparoscopie expliquées précédemment, son abdomen est tondu, lavé et désinfecté. Le système reproducteur est extériorisé et l'embryon est transféré dans la corne utérine, l'utérus ou l'oviducte grâce à la pointe d'une aiguille stérile permettant de perforer légèrement l'endroit considéré. Une pipette contenant les embryons est insérée et le transfert peut avoir lieu.

Des méthodes de transfert non-invasives existent, mais elles semblent surtout efficaces chez le cheval et le bovin. Une de ces méthodes consiste à faire passer un tube à travers le cervix pour déposer le ou les embryons dans l'utérus. Dans ce cas, le passage du cervix doit être aisé, ce qui n'est pas le cas chez le mouton (*Murray, 1978*).

Néanmoins, la laparoscopie permet de limiter la lourdeur de l'opération : par endoscopie, l'ovaire portant le ou les corps jaunes est repéré. Une pince atraumatique est insérée par une petite incision dans la paroi abdominale et permet de saisir et extérioriser uniquement quelques centimètres de la corne située du côté de l'ovaire portant le corps jaune. Les embryons sont injectés dans cette petite portion qui est ensuite relâchée et retourne à sa place dans la cavité abdominale. Aucune suture n'est nécessaire après cette opération.

Le transfert d'embryons congelés est réalisé dans les 30 minutes après le retrait du cryoprotecteur. Des essais ont également été réalisés sans enlever ce cryoprotecteur et sans évaluer la qualité des embryons avant le transfert. Dans ce cas, on utilise un instrument particulier et tout le contenu de la paillette est transféré chez la receveuse, ce qui augmente de 10 fois le volume de liquide injecté dans l'utérus par rapport au transfert classique, mais cela ne semble pas avoir d'impact négatif (*Baril et al, 1993*).

Généralement, les taux de gestation observés sont les mêmes pour les embryons transférés « en frais » que pour ceux qui sont soumis à une vitrification mais le taux de survie est légèrement supérieur dans le premier cas. Le fait d'enlever ou non le cryopréservateur n'apparemment pas d'effet sur les taux de gestation, d'agnelage et de survie.

Si les embryons ont subi une vitrification, les résultats observés seront meilleurs pour ceux obtenus in vivo tandis que, si les embryons sont transférés « en frais », on n'observe aucune différence, qu'ils soient issus d'une fécondation in vivo ou in vitro (*Martinez, 1997*).

Le taux de survie des embryons est défini comme la proportion d'embryons transférés résultant en agneaux à terme (*Mc Millan et Hall, 1994*). Ce taux peut être influencé par toute une série de facteurs :

- Lorsque c'est possible, les techniques non-chirurgicales sont préférables car elles sont moins risquées pour la santé de la brebis, qu'il s'agisse de la donneuse ou de la receveuse et leur coût est moins important. Cependant, de telles techniques entraînent des taux de gestation moindres.
- L'utérus peut être victime d'une infection, ce qui réduit le taux de survie des embryons. Néanmoins, ce problème peut être évité en utilisant des méthodes aseptiques ainsi que des antibiotiques.
- Les taux de survie observés sont plus élevés pour les embryons plus avancés en âge ; par exemple, le taux de survie sera plus important pour un embryon au jour 4 transféré dans un utérus au jour 3 que pour un embryon au jour 3 transféré au jour 3.
- Comme cité précédemment, on observe une diminution importante du taux de survie si la différence dans les synchronisations entre donneuses et receveuses est supérieure à 24 heures.

Les recherches qui ont été continuées et rapportées dans ce mémoire ont pour but d'améliorer les techniques de reproduction ovine. Pour augmenter l'intensité de la sélection et en accélérer le progrès, certains éleveurs de pointe souhaitent pouvoir utiliser les avantages du transfert d'embryons. Cette technique, bien maîtrisée chez les bovins, est encore au stade expérimental chez les ovins et quelques laboratoires dont le laboratoire de Physiologie animale des Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix à Namur se penchent sur le problème.

Comme vu dans la revue bibliographique de ce travail, des laboratoires étrangers sont parvenus à mettre au point des techniques de superovulation assez fines, il n'en est malheureusement pas encore de même en ce qui concerne la race Texel, principale race dans notre pays.

L'objectif de ce travail est d'affiner les techniques de superovulation chez la brebis Texel dans le but d'obtenir un protocole expérimental le plus fiable et reproductible possible. Les techniques de transfert proprement dit doivent aussi être améliorées, mais un travail supplémentaire serait nécessaire pour ce faire.

Le protocole de superovulation FSH-LH ayant fait ses preuves, il reste de vigueur. L'injection de FSH selon un mode décroissant induit la croissance folliculaire et est conservée, seules les doses de FSH ont été modifiées en vue d'encore améliorer les performances de ce protocole.

Ce travail s'est surtout penché sur l'amélioration des techniques de blocage de l'hypophyse initiées au laboratoire depuis deux ans. L'utilisation de l'antagoniste de la GnRH Antarelix n'a pas été reconduite dans ce travail. En effet, au vu des résultats des travaux précédents, ses effets ne sont pas mieux que ceux de l'agoniste Buséreléline. En outre, l'Antarelix était gracieusement offert à titre expérimental par la firme Europeptides, ce qui n'est actuellement plus le cas. Au vu du coût élevé de cette substance et du fait que celle-ci n'a pas laissé entrevoir de meilleurs résultats que l'agoniste, il a été décidé de se concentrer sur l'utilisation de la Buséreléline dont les premiers résultats laissent espérer au moins autant de son utilisation que de celle de l'antagoniste.

## Matériel et méthodes

*Tableau 2 : brebis utilisées dans les différentes expériences*

N°SANITEL	1ère expérience	2ème expérience	3ème expérience
7261	Oui	Oui	Oui
7283	Oui	Oui	Oui
3124	Oui	Oui	Oui
7263	Oui	Oui	Oui
3086	Oui	Oui	Oui
3102	Oui	Oui	Oui
3104	Oui	Oui	
7264	Oui	Oui	Oui
1807	Oui		
7276		Oui	Oui
3346		Oui	Oui
7168		Oui	Oui
7273		Oui	
7232		Oui	Oui
7223	Oui	Oui	Oui
7298		Oui	Oui
1814			Oui
3350			Oui



## 1. Les animaux

Trois séries d'expériences ont été réalisées dans le cadre de ce mémoire. Pour ces trois expériences, 18 brebis ont été utilisées. Ces 18 brebis sont toutes élevées au Centre de Recherches Ovines (CRO) à Faulx-Les-Tombes. Les numéros SANITEL des différentes brebis utilisées ainsi que leur participation aux différentes expériences sont donnés dans le tableau suivant (*tableau 2*). Il s'agit de brebis de race Texel, choisies car elles appartiennent à une race pure soumise au plus grand effort de sélection dans notre pays.

## 2. Les produits utilisés

Le tableau 3 donne la liste des produits utilisés lors des expériences.

La Busérelina sera employée dans les trois expériences. Elle sera administrée par spray nasal dans la première alors que des mini-pompes osmotiques seront utilisées pour son administration dans les deux dernières expériences.

La synchronisation du troupeau sera réalisée par la pose des éponges de progestagènes. Elles seront remplacées après 7 jours afin de maintenir un taux élevé de progestagènes dans le sang. L'éponge est fixée au bout d'un applicateur en PVC (préalablement désinfecté) et placée dans le fond du vagin. Une ficelle fixée à l'éponge et qui sort de la vulve servira au retrait de l'éponge.

Les produits utilisés pour induire la maturation folliculaire ainsi que l'ovulation sont la FSH et la LH. Ces hormones seront injectées en intramusculaire après avoir été diluées dans du solvant. Ce sont des hormones purifiées extraites de l'hypophyse de porc. Elles présentent la particularité d'être très pures, la FSH notamment ne présentant que 0 % d'activité LH contre les 20 % habituels dans le commerce. Ces hormones sont fournies par le laboratoire de Physiologie de la reproduction de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'ULg (Professeur J.F. Beckers).

La Xylocaïne induit une anesthésie locale après injection sous-cutanée à l'endroit où seront insérés les trocars.

La pénicilline est injectée en intramusculaire dans la cuisse pour éviter des inflammations ultérieures.

Notons que tous les instruments chirurgicaux baignent dans un bain désinfectant d'Hibitane®.

*Tableau 3: liste des produits utilisés et leur rôle*

Produit	Description et constitution	Rôle
Eponges de progestérone	Eponges intra-vaginales VERAMIX® 60 mg d'acétate de médroxyprogestérone	Blocage de l'ovulation et synchronisation des brebis
Pénicilline	DUPHAPEN® STREP Benzylpénicilline procaine 200.000IU Dihydrostreptomycine sulfas 250 mg Excipients	Antibiotique
Xylocaïne	XYLOCAINE® 2% Lidocaïne 20 mg/ml	Anesthésique local
Rompun	ROMPUN® 2% (Bayer)	Sédatif
Hibitane Liquide/savon	HIBITANE® 5% Chlorhexidin diglucon 50 mg/ml	Désinfectant
Bombe bleue	Oxytétracycline	Désinfectant cicatrisant
Buséréline	SUPREFACT® Nasal (Spray) 1 mg/ml Buséréline Acétate: 0,1505mg	Blocage hypophysaire
FSH	FSH purifiée 0% LH de la Faculté Vétérinaire de Liège	Croissance et maturation folliculaire
LH	LH purifiée de la Faculté Vétérinaire de Liège	Ovulation
Pompes osmotiques	Mini-pompes osmotiques ALZET® 2ML2 5µl/h pendant 14 jours 2 ml	Administration continue et prolongée de la Buséréline

### 3. Techniques utilisées

#### 3.1. La laparoscopie

La technique utilisée pour le dénombrement des populations folliculaires sur les ovaires, le comptage des corps jaunes ainsi que pour l'insémination est la laparoscopie.

Antérieurement, les techniques d'insémination intra-utérine et de récupération d'embryons chez les brebis impliquaient une chirurgie importante et des manipulations de l'utérus. Plus tard a été émise l'hypothèse que ces procédures traumatisantes pour l'animal pourraient réduire la fertilité des brebis en provoquant des adhésions post-opératoires. C'est pourquoi des techniques utilisant la laparoscopie ont été développées et peuvent maintenant être appliquées (*Lymberopoulos et al, 2001*).

La laparoscopie est une technique d'exploration des cavités internes qui utilise un système optique présentant les propriétés de propagation de la lumière dans une fibre de verre. Le matériel constitue l'endoscope tandis que la laparoscopie désigne l'exploration de la cavité abdominale distendue par un pneumopéritoine, c'est à dire une insufflation d'air dans la cavité abdominale.

Les brebis soumises à cette technique sont à jeun depuis 24 heures afin de réduire le volume du rumen, ce qui facilite l'examen. La brebis est positionnée en décubitus dorsal sur la table d'endoscopie. Le ventre est alors tondu et désinfecté. Un anesthésique local est injecté en évitant les vaisseaux sanguins, l'arrière-train est levé d'un angle de 40° par rapport à l'horizontale.

L'endoscope est connecté à la source de lumière froide et la canule est reliée à la bombonne de gaz. La canule munie du premier trocart est insérée à gauche de la ligne médiane dans la cavité abdominale, puis remplacé par l'endoscope. La seconde canule recevant les instruments d'insémination ou de manipulation est insérée à droite de la ligne médiane. L'insufflation d'un volume d'air rend visible le contenu abdominal.

Pour le comptage des follicules et des corps jaunes, une pince atraumatique insérée dans la canule de droite permet la manipulation des viscères abdominaux. En ce qui concerne l'insémination, un pistolet d'insémination sera inséré dans la même canule.

#### 3.2. La collecte chirurgicale (laparotomie)

Les deux méthodes de collecte citées dans la revue bibliographique ont été utilisées dans ces expériences, la collecte chirurgicale et la méthode par endoscopie

Pour la collecte chirurgicale, l'animal est placé sur une table de contention en décubitus dorsal avec une inclinaison antéro-postérieure de 30 à 45°. La brebis est anesthésiée localement et on lui administre un sédatif. La paroi ventrale est soigneusement rasée, lavée puis désinfectée et recouverte d'un champ opératoire.

*Tableau 4: Milieu de récolte et de conservation des embryons : Phosphate Buffered Saline (P.B.S.)*

Solution 1	Mg/litre	Solution 2	Mg/litre
CaCl <sub>2</sub> 2 H <sub>2</sub> O	132.5	NaCl	8000
MgCl <sub>2</sub> 6 H <sub>2</sub> O	100.0	KCl	200
		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	200
		Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1150
		B.S.A.(fraction V)	4000
		D-glucose	1000
		Na pyruvate	36
		Sulfate de streptomycine	50
		Na pénicilline-G	1 000 000 U.I.

Dissoudre les réactifs des solutions 1 (dans 200ml) et 2 (dans 800 ml d'H<sub>2</sub>O) et mélanger ensuite.

Ajuster le pH à 7,3.

La pression osmotique peut varier entre 290 et 310 mosmoles.

Stériliser la solution finale par passage sur un filtre 0.22 µm et conserver à +4°C.

Une incision de 8 à 10 cm effectuée sur la ligne blanche en avant de l'attache de la mamelle permet d'extérioriser les cornes utérines et de dénombrer les corps jaunes présents sur les ovaires.

Dans le cas d'une collecte réalisée au 6<sup>ème</sup> jour, le rinçage de chaque corne utérine est réalisé séparément. Une ponction effectuée à la base de la corne permet d'introduire une aiguille de perfusion dans la lumière utérine. La lumière de la corne utérine est obstruée à sa base en comprimant la corne autour de l'aiguille à l'aide d'une pince atraumatique ou avec les doigts. A l'extrémité opposée de la corne, près de la jonction utéro-tubaire, une seconde ponction est réalisée par laquelle un cathéter est introduit de 1 à 2 cm dans la lumière utérine et fixé à l'aide d'une pince atraumatique assurant une bonne étanchéité.

Le matériel ainsi mis en place, le milieu de collecte (40 à 50 ml, tableau 4) maintenu à +37°C est injecté soit à la base de la corne, soit près de la jonction utéro-tubaire. Le milieu entraînant les embryons est récupéré à l'extrémité opposée par la sonde ou le cathéter relié à un tube stérile placé dans un bain-marie à +37°C.

Lorsque le lavage successif des deux cornes est terminé, un antibiotique en solution est administré, une ligature est ensuite pratiquée au niveau du péritoine puis de la peau

### 3.3. La collecte par endoscopie

La méthode laparoscopique a été développée chez la brebis (*Mc Kelvey et al., 1986*) et la chèvre (*Vallet et al., 1987*) afin d'améliorer les possibilités de répétition de la collecte chez les femelles donneuses permanentes.

L'animal est placé dans la même position que lors d'une collecte chirurgicale et est anesthésié localement. Une première ponction réalisée 4 à 5 cm en avant de la mamelle et à 10-15 cm à gauche de la ligne blanche permet la mise en place d'une canule (diamètre 10 mm) recevant l'endoscope.

Après avoir insufflé de l'air dans la cavité abdominale pour séparer les viscères des organes génitaux (création d'un pneumopéritoine), une seconde canule (diamètre 5 mm) est mise en place à l'opposé de la première par rapport à la ligne blanche, afin d'y introduire une pince atraumatique pour la manipulation du tractus génital. A l'aide de la pince, les corps jaunes présents sur chaque ovaire peuvent être dénombrés. Une corne est saisie à sa base afin de la ponctionner avec une aiguille.

Une troisième canule de 5 mm de diamètre placée au niveau de la ligne blanche et à 15 cm de l'attache de la mamelle permet le passage d'une sonde 3 voies dont l'extrémité est introduite au lieu de ponction dans la lumière utérine. Après pincement des deux extrémités de la corne pour éviter la remontée ou la redescende du milieu de collecte contenant les embryons, le milieu de collecte peut alors être injecté par le corps de la sonde à raison de 40 à 50 ml par corne. La pression ainsi créée à l'intérieur de la corne utérine permet le retour du milieu par le cathéter.

### 3.4. La synchronisation des receveuses

Les brebis receveuses sont des croisées Laitier-Suffolk de l'élevage du CRO de Faulx-Les-Tombes. Elles ont été choisies pour leur bonne fécondité naturelle, leur aptitude laitière et leur phénotype fort différent des Texel.

Ces brebis doivent être synchronisées afin de se retrouver au jour 7 du cycle au moment du transfert. Cela signifie qu'elles seront synchrones avec les donneuses lors du transfert des embryons frais. Pour cela, des éponges de progestagènes sont placées chez ces receveuses au même moment que chez les brebis donneuses correspondantes.

### 3.5. Dosages hormonaux

#### 3.5.1. Prises de sang

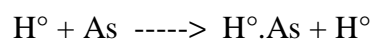
Durant toute l'expérience, des prises de sang journalières ont été effectuées afin d'évaluer les variations de FSH et de LH. Ces dosages nous permettront de vérifier et quantifier en quelles proportions les traitements inhibiteurs ont été efficaces.

Les prises de sang sont réalisées tous les jours. Un garrot est placé à la base du cou permettant de mettre en évidence la veine jugulaire. Une aiguille est introduite dans cette veine, le sang est recueilli dans des tubes contenant une goutte d'héparine (5000 UI/ml) afin d'éviter la coagulation.

Les tubes sont centrifugés durant 15 minutes à 3000 tours/minute afin de récupérer le plasma. Celui-ci est conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.5.2. Dosages

Le RIA (radio immuno assay) est une technique permettant de doser des hormones dans les fluides corporels dont le sérum (*Crowe M.A. et al, 1997*). Il s'agit d'une technique basée sur la compétition entre une quantité déterminée d'hormone marquée par la fixation d'un ou plusieurs atomes radioactifs et une quantité inconnue de la même hormone, non marquée, présente dans l'échantillon à analyser vis-à-vis d'un antisérum qui leur est spécifique. L'hormone froide peut se lier avec l'antisérum spécifique et la réaction finale peut s'écrire de la manière suivante :



$\text{H}^{\circ}$  : Hormone froide

As : Antisérum

On ajoute alors l'hormone marquée et la relation obtenue est la suivante :



$\text{H}^{*}$ : Hormone marquée

D'après cette relation, on conclut que l'hormone se trouve sous 2 formes :

- Une liée à l'anticorps ( $H^{\circ}.As$  et  $H^*.As$ )
- L'autre libre ( $H^{\circ}$  et  $H^*$ )

Pour une même quantité d'anticorps et d'hormone marquée introduite au départ, on obtient d'autant plus de complexes  $H^*.As$  qu'il y a moins d'hormone froide dans le milieu. De même, la quantité liée à l'anticorps est d'autant plus faible que la teneur en  $H^{\circ}$  de l'échantillon est plus élevée.

Dans les expériences réalisées lors de ce mémoire, la séparation des phases liée et libre est réalisée par la méthode du double anticorps. Il s'agit d'une méthode consistant à précipiter le complexe hormone - anticorps par fixation sur des antigamma-globulines de lapin (ARGG) produites par un mouton. La comparaison avec une gamme étalon établie avec l'hormone de référence permet de déterminer la concentration en hormone du plasma.

Cette technique est appliquée aux plasmas ainsi qu'à une série de solutions d'hormone de concentrations connues destinées à l'établissement d'une courbe de standardisation.

### 3.5.3. Calcul des résultats

Pour le calcul des valeurs, les points de la courbe standard sont introduits dans un logiciel de fitting de calcul (MATLAB R12) qui calcule les paramètres de la formule correspondant à un équilibre entre deux hormones ( $H^{\circ}$  et  $H^*$ ) pour leur fixation sur un antisérum spécifique :

$$A = A_0 (C_m/C_m+C_f) + BG$$

A : radioactivité mesurée de la phase liée

$A_0$  : radioactivité lorsque la concentration en hormone froide est nulle (-BG)

$C_m$  : concentration en hormone marquée

$C_f$  : concentration en hormone froide

BG : radioactivité non spécifique

La liste des produits utilisés pour les dosages hormonaux est présentée dans le tableau 5.

### Protocole pour le dosage de la FSH

Les produits préparés en laboratoire pour le dosage de la FSH sont présentés dans les tableaux 6, 7, 8 et 9.

Ce dosage est réalisé sans extraction et en présence de FSH purifiée marquée à l' $I^{125}$ . Cette dernière est préparée au laboratoire par marquage de 4  $\mu g$  de oFSH à l' $I^{125}$  par la technique d'oxydation à la chloramine T.

Les manipulations du RIA sont les suivantes. Un échantillon de 50  $\mu l$  de plasma est additionné de 50  $\mu l$  d'anticorps spécifique (AFPC 288113). Après 2 à 4 heures d'incubation, 50  $\mu l$  d'hormone marquée (20 000 cpm) y sont mélangés par vortex et l'équilibre s'établit pendant la nuit. Le second anticorps (ARGG) en solution tampon avec PEG (6 %) et cellulose (0,5 %) est ajouté à raison de 250  $\mu l$ . Après 2 à 4 heures, les tubes sont centrifugés, le

surageant éliminé à la trompe à vide, le culot resuspendu dans du tampon phosphate et recentrifugé. Après élimination du surageant, le culot est analysé dans un compteur LKB Wallar 1277 GammaMaster à passeur d'échantillon.

Une courbe standard allant de 0 à 50 ng/ml est réalisée à l'aide d'oFSH (réf : NIAMDD-oFSH-RP-1, AFP 5679 C).

Les références de la FSH pour le marquage sont les suivantes : NIAMDD-oFSH-RP-1 (AFP5679C)

La sensibilité du dosage est de 0,08 ng/ml, ses coefficients de variation intra et inter-essais respectivement de 5,5 % et de 10,5 %. Les valeurs de spécificité du test sont : oLH : 0,17 %, oGH : 0,03 %, oPRL : < 0,01 %.

#### Protocole pour le dosage de la LH

Les solutions préparées en laboratoire pour ce dosage sont données dans les tableaux 10, 11, 12 et 13.

Le dosage de la LH est réalisé de façon identique à celui de la FSH avec 50 µl d'anticorps spécifique de la LH (NIDDK-oLH-1, AFP-192279).

Les références de la LH sont les suivantes : NIDDK-oLH-I-2 (AFP 7071B).

Les caractéristiques du dosage sont les suivantes :

- Sensibilité : 0,07 ng/ml
- Coefficient de variation intra-test : 7,5 %
- Coefficient de variation inter-test : 10,5 %
- Spécificité : bTSH : 0,15 % ; oFSH : 5,4 % ; oGH : 0,57 % ; oPRL : < 0,01 %.

*Tableau 5: Liste des produits utilisés pour les dosages et leur références*

Acétate éthyle	Vel 1355
Cyclohexane	Acros organics 176810025
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	Merck 6346
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck 6586
NaCl	Vel 1723
NaOH	Merck 6498
Gélatine	VEL 1381
Polyéthylène glycol	Vel 8727
Ecosint	LS-273
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	UCB 1627
ARGG	Sheep-ARGG Centre Econom Rurale Marloie
Cellulose	Merck 2331
AsFSH	NIAMDD.NIH, AFPC 288113
FSH pour marquage	NIAMDD-oFSH-I-1 (AFP-4117A)
FSH pour standards	NIAMDD-oFSH-RP-1 (AFP-5679C)
AsLH	NIADDK-anti oLH (AFP-192279)
LH	NIADDK-oLH-I-3 (AFP-9598B)



*Tableau 6: Solutions préparées en laboratoire pour le dosage de la FSH*

Tampon phosphate 0,6M	7,5g de $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (PM=136,09) 77,9g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (PM=141,96) 1l d'eau distillée
Tampon Wide 0,06M	Diluer 10 fois le tampon phosphate 0,6M Ajuster le pH à 7,55
Tampon BSA 0,5 %	1l de tampon Wide 5g de BSA
ARGG	5ml d'ARGG 100ml de tampon BSA 6g de PEG 0,5g de cellulose

*Tableau 7: Préparation de l'AsFSH*

AsFSH	1ml dilué au huitième dans 2 % de NRS-PBS Dilution finale conseillée : 1/80 000
Solution stock	1ml d'AsFSH 49ml de tampon Wide Mélanger Répartir en 25 fois 2ml Dater Conserver au congélateur
Solution de travail	2ml de solution stock 48ml de tampon BSA

*Tableau 8: Préparation de la FSH pour le marquage (uniquement)*

Solution stock à 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	72 $\mu\text{g}$ de FSH à marquer 720 $\mu\text{l}$ de tampon Wide Conserver au congélateur
Marquage de la FSH	Mettre 25 $\mu\text{l}$ de Wide dans de l'iode centrifugé 40 $\mu\text{l}$ de solution stock (soit 4 $\mu\text{g}$ ) 20 $\mu\text{l}$ de chloramine T (40 $\mu\text{g}/10\text{ml}$ ) Laisser agir 30 secondes 25 $\mu\text{l}$ de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ Mélanger à la pipette Prélever la totalité du volume et l'ajouter à la colonne Attendre qu'il soit totalement absorbé par le sephadex Ajouter du Wide pour la chromatographie Recueillir des fractions de 1ml Vérifier l'activité au compteur Pooler les 2 ou 3 tubes correspondant au maximum d'activité du premier pic
Solution de travail	Diluer la solution marquée de telle sorte

	qu'elle corresponde à 20 000 cpm par 50µl
--	---

*Tableau 9: Préparation de la FSH pour les standards (uniquement)*

Solution stock à 500ng/100µl	5µg de FSH 1000µl de tampon BSA Mélanger Répartir en 10 tubes de 100µl Mettre au congélateur
Solution à 50ng/ml	100µl de solution stock 9900µl de tampon BSA mélanger

*Tableau 10: Préparation de l'AsLH*

AsLH	Dilution 1/100
Solution stock	1ml de solution 1/100 49ml de tampon BSA Répartir en 25 fois 2ml Dater Conserver au congélateur
Solution de travail	2ml de solution stock 73ml de tampon BSA

*Tableau 11: Préparation de la solution stock de LH*

Solution stock à 250mg/ml	500mg de oLH 2ml de tampon Wide et mélanger Répartir en 8 fois 250µl Dater Conserver au congélateur
---------------------------	---

*Tableau 12: Marquage de la LH*

Solution pour marquage	Solution stock répartie en 10 fois 25µl et conservée au congélateur
Marquage de la LH	20µl de solution pour marquage (5µg) 25µl de tampon Wide 20µl de chloramine T (40µg/10 ml) Laisser agir 30secondes 25µl de Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> Mélanger à la pipette Prélever la totalité du volume et l'ajouter à la colonne Attendre qu'il soit totalement absorbé par le sephadex Ajouter du Wide pour la chromatographie Recueillir des fractions de 1ml

	Vérifier l'activité au compteur Pooler les 2 ou 3 tubes correspondant au maximum d'activité du premier pic
Solution de travail	Diluer la solution marquée à 20 000cpm/50µl

*Tableau 13: Préparation de la LH pour les standards*

Solution à 10 000ng de LH/ml	250µl de solution stock 6,250ml de tampon BSA Mélanger Répartir en 6 fois 1 ml Dater Conserver au congélateur
Solution à 200ng de LH/ml	1ml de solution à 10 000ng/ml 49ml de tampon BSA Mélanger Répartir en tubes de 3ml Dater conserver au congélateur

#### 4. Plan expérimental

Une première expérience a été conduite en vue d'analyser l'effet de la Buséreliné administrée par spray nasal. L'insémination et le transfert des embryons récoltés ont été pratiqués.

Au vu des résultats, une deuxième expérience a été menée, uniquement basée sur la superovulation, sans fécondation ni transfert, en administrant l'agoniste par des mini-pompes osmotiques.

Une troisième et dernière expérience a enfin été menée, les doses de Buséreliné ont été augmentées et une augmentation des doses de FSH a été appliquée. L'insémination des brebis a suivi ces traitements.

Au terme de ces traitements, différentes analyses ont été réalisées : les taux endocrines de FSH et de LH, la population folliculaire à différents stades du traitement, le taux d'ovulation et le taux de récolte des embryons s'il y a eu fécondation.

##### *4.1. Première expérience*

Le tableau 14 illustre le planning de cette première expérience. Les 10 brebis utilisées lors de cette expérience sont réparties en 2 groupes de 5. Les animaux du premier groupe reçoivent de la Buséreliné, le second groupe est le groupe témoin qui ne recevra que le traitement FSH-LH.

Une endoscopie est pratiquée sur toutes les brebis le jour du début des traitements pour caractériser la population folliculaire à ce moment et dénombrer le nombre de corps jaunes.

Le groupe Buséreliné reçoit de l'agoniste GnRH durant 20 jours. La Buséreliné est administrée par spray nasal (Suprefact®nasal) à raison de  $2 \times 100 \mu\text{g/jour}$ . Notons qu'on recommande chez la femme  $900 \mu\text{g/jour}$  avec le même produit mais que les publications montrent l'efficacité de  $40 \mu\text{g/jour}$  par pompes osmotiques ou injection. Les animaux reçoivent une inhalation de  $100 \mu\text{g}$  à 9h et la même à 21h, soit à 12h d'intervalle.

Le traitement de superovulation (FSH-LH) commence le lendemain de l'arrêt de la Buséreliné (l'hypophyse est à ce moment bloquée pour plusieurs jours et les taux endogènes de FSH et de LH devraient donc être minimales) par 2 injections intramusculaires de FSH. Celle-ci sera administrée de la même façon durant 4 jours, et ce en doses décroissantes. Le but de cette administration de FSH est de stimuler la croissance folliculaire terminale. Un flacon de FSH contient 35 unités Armour (UA) et 17,5 ml de solvant y sont ajoutés. Une injection de 0,5 ml correspond à 1 unité. La FSH est injectée en doses décroissantes à raison de :

6 UA	matin et soir le premier jour du traitement de superovulation
5 UA	le deuxième
3 UA	le troisième
2 UA	le quatrième jour

Tableau 14 : planning des essais de la première expérience

Planning Essais Superovulation, Collecte et Transfert d'embryons 2004 (Jan/Fev)													
		Busé					Témoin					5 Porteuses (Busé)	5 Porteuses (Témoin)
Brebis superovulées N° exp.		7261	7283	3124	7263	7223	3086	3102	3104	7264	1807	1,2,3,4,5	6,7,8,9,10
Date		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Sam	11-janv	Début PS					Début PS						
Dim	12-janv												
Lun	13-janv	Spray Busé + Endoscopies 1											
Mar	14-janv	Spray Busé											
Mer	15-janv	Spray Busé					Endoscopies 1 et éponge						Pose éponges
Jeu	16-janv	Spray Busé											
Ven	17-janv	Spray Busé											
Sam	18-janv	Spray Busé											
Dim	19-janv	Spray Busé											
Lun	20-janv	Spray Busé											
Mar	21-janv	Spray Busé											
Mer	22-janv	Eponge + Spray Busé					Eponge : changer					Pose ép	
Jeu	23-janv	Spray Busé					Endoscopies 2						
Ven	24-janv	Spray Busé											
Sam	25-janv	Spray Busé											
Dim	26-janv	Spray Busé					FSH 6+6						
Lun	27-janv	Spray Busé					FSH 5+5						
Mar	28-janv	Spray Busé					FSH 3+3						
Mer	29-janv	Eponge : changer + Spray Busé					Ret.ép.8h FSH 2+2 LH 0,06 + 0,09 à jeûn des AX) (Mise						Ret ép. 8h
Jeu	30-janv	Spray Busé					LH 2 16h						
Ven	31-janv	Spray Busé + Endoscopies 2					IA IU 12h Endoscopies 3						
Sam	01-févr	Spray Busé											
Dim	02-févr	FSH (6+6)											
Lun	03-févr	FSH 5+5											
Mar	04-févr	FSH 3+3					Mise à jeûn des AX						
Mer	05-févr	Ret.ép.8h FSH 2+2 LH 0,06 + 0,09 à jeûn des AX) (Mise										Ret ép. 8h	
Jeu	06-févr	LH 2 16h					Fin PS Endoscopies 4 (CJ) collecte et transfert embryons						Transferts E frais
Ven	07-févr	IA IU 12h Endoscopie 3											
Sam	08-févr												
Dim	09-févr												
Lun	10-févr												
Mar	11-févr	Mise à jeûn des AX											
Mer	12-févr												
Jeu	13-févr	Fin PS Endoscopies 4 (CJ) collecte et transfert embryons										Transferts E frais	
Ven	14-févr	PGF (estrumate) à toutes les donneuses											

### Légende :

- Busé : Buséréline
- PS : Prises de Sang
- Ret ép 8h : retrait des éponges de progestagène à 8h
- IA IU : insémination artificielle intra-utérine
- CJ : corps jaune
- E : embryons
- AX : animaux

La LH est administrée le dernier jour du traitement FSH ainsi que le lendemain. Elle est injectée en intramusculaire, en doses croissantes. La fiole de LH contient 3 mg d'hormone purifiée. Puisque 6 ml de solvant y sont ajoutés, une injection de 1 mg nécessite un prélèvement de 2 ml. Elle est injectée à raison de 60µg à 8 heures et 90 µg à 20 heures le jour de l'injection des 2 UA de FSH, et le lendemain à raison du reste des 3 mg en intramusculaire, 16 heures après le retrait de l'éponge.

L'éponge de progestagène est retirée 32 heures avant la dernière injection de LH, sensée faire ovuler les animaux.

Une endoscopie de contrôle de la population folliculaire est réalisée l'avant-veille du début du traitement superovulatoire chez les deux groupes.

A la fin du traitement, les brebis sont inséminées par insémination artificielle intra-utérine (IAIU) une vingtaine d'heures après la dernière injection de LH, celle-là même sensée mimer la décharge pré-ovulatoire de LH.

Les corps jaunes sont dénombrés pour vérifier les taux d'ovulation. La collecte et le transfert des embryons éventuels ont lieu 6 jours après l'insémination.

Des prostaglandines sont données le lendemain de la collecte à toutes les donneuses.

Enfin, des prises de sang quotidiennes sont réalisées sur toutes les femelles donneuses afin de doser les taux de FSH et de LH.

#### 4.2. Deuxième expérience

Au vu des résultats de la première expérience, il a été décidé d'en mener une deuxième qui ne porte que sur la superovulation. Les animaux de cette expérience subissent un traitement de superovulation mais ne sont pas inséminés et il n'y a donc pas de collecte ni de transfert d'embryons.

Le but de cette expérience est de comparer l'effet de la durée du traitement à la Buséréline sur la population folliculaire et le taux d'ovulation.

La Buséréline est administrée dans cette expérience par des mini pompes osmotiques Alzet® 2ML2. Ces pompes diffusent leur contenant liquide à raison de 5µl/h pendant 14 jours et ont une contenance de 2 ml. Les brebis reçoivent 100µl/jour de Buséréline, ce qui correspond à deux fois plus que ce qui est recommandé dans la littérature, mais la dose recommandée a été expérimentée sur les brebis Texel l'an passé et n'as pas donné de résultats encourageants.

La Buséréline utilisée est sous forme de Suprefact® 1mg/ml. Comme les pompes diffusent pendant 14 jours et que nous avons besoin de 100 µg/jour de Buséréline, 1400µg de l'antagoniste sont nécessaire par pompe de 2ml. Les pompes doivent donc contenir une solution de Buséréline à 0,7mg/ml; 7ml de Suprefact® sont à cet effet dilués dans 3ml d'eau distillée. Les pompes une fois remplies à l'aide d'une seringue prévue à cet effet passent la nuit dans une solution saline 0,9% à 37°C la veille de leur pose.

Tableau 15: Planning des essais de superovulation

PLANNING ESSAIS SUPEROVULATION MARS 2004																	
	Busé 21 jours					Busé 14 jours					Témoin						
N° SANITEL	7276	3346	7283	7261	3086	7168	7273	7263	3124	3102	3104	7232	7264	7223	7298		
N° EXPERIENC	11	12	2	1	6	13	14	4	3	7	8	15	9	5	10		
Mer 03-mars		Endoscopie 1 + pose pompes Buséreléline															
Lun 04-mars																	
Ven 05-mars																	
Sam 06-mars																	
Dim 07-mars																	
Lun 08-mars																	
Mar 09-mars																	
Mer 10-mars						Endoscopie 1 + pose pompes Buséreléline											
Jeu 11-mars																	
Ven 12-mars		Changer pompes + Pose des éponges				Pose des éponges					Endoscopie 1 + Pose des éponges						
Sam 13-mars																	
Dim 14-mars																	
Lun 15-mars																	
Mar 16-mars																	
Mer 17-mars																	
Jeu 18-mars																	
Ven 19-mars		Changer les éponges				Changer pompes + Changer les éponges					Changer les éponges						
Sam 20-mars																	
Dim 21-mars																	
Lun 22-mars																	
Mar 23-mars		Retrait des pompes + endoscopie 2				Retrait des pompes + endoscopie 2					Endoscopie 2						
Mer 24-mars			FSH (6+6)					FSH (6+6)					FSH (6+6)				
Jeu 25-mars			FSH (5+5)					FSH (5+5)					FSH (5+5)				
Ven 26-mars			FSH(3+3)					FSH(3+3)					FSH(3+3)				
Sam 27-mars	Retrait des éponges 8h		FSH (2+2)	LH (0,06+0,09)			Retrait des éponges 8h	FSH (2+2)	LH (0,06+0,09)			Retrait des éponges 8h	FSH (2+2)	LH 0,06+0,09			
Dim 28-mars			LH 3 16h(IV)					LH 3 16h(IV)					LH 3 16h(IV)				
Lun 29-mars			Endoscopie 3					Endoscopie 3					Endoscopie 3				
Jeu 08-avr						ENDOSCOPIES A TOUTES LES BREBIS POUR LES CORPS JAUNES.											

La pose des éponges de progestérone, leur changement après 7 jours ainsi que le traitement FSH-LH sont identiques à la première expérience. Seule la dernière injection de LH est pratiquée en intraveineuse et plus en intramusculaire, dans le but d'avoir un pic pré-ovulatoire de LH plus important.

Tout comme dans la première expérience, trois endoscopies sont pratiquées chez toutes les brebis :

- la première le premier jour de l'expérience pour caractériser la population folliculaire des animaux ainsi que l'état du système reproducteur
- la deuxième avant le traitement superovulatoire pour voir l'effet du blocage hypophysaire
- la troisième et dernière enfin le lendemain de la dernière injection de LH pour dénombrer le nombre de corps jaune caractérisant le taux d'ovulation.

Ces endoscopies se déroulent exactement comme dans la première expérience.

Les numéros SANITEL des 15 brebis participant à l'expérience sont cités dans le tableau 2. Ces 15 brebis seront aléatoirement divisées en 3 groupes de 5 animaux :

- Le premier groupe reçoit 100µg de Busérelina par jour pendant 21 jours. Les pompes sont remplacées au bout de 9 jours. Ce groupe sera appelé « Busé 21 ».
- Le deuxième groupe reçoit la même quantité de Busérelina, mais pendant 14 jours. Les pompes ayant au préalable été utilisées, nous les changeons également après 9 jours par souci de sécurité. On l'appellera « Busé 14 ».
- Le troisième et dernier groupe ne reçoit pas de traitement bloquant, il sera le groupe témoin.

Les mini pompes sont placées en sous-cutané entre les omoplates de l'animal. Une incision de quelques centimètre est pratiquée dans le dos de l'animal à cet effet, les pompes y sont introduites et une suture est pratiquée.

Des prises de sang journalières sont réalisées sur tous les animaux.

Le tableau 15 illustre le planning de cette deuxième expérience.

#### 4.3. Troisième expérience

Après analyse des résultats des deux premières expériences, une troisième est programmée. Les doses de Busérelina sont augmentées, de nouvelles mini pompes sont utilisées, des doses de FSH plus importantes sont testées.

Le Suprefact® (1mg Busérelina/ml) est injecté dans les pompes sans être dilué. Il en résulte une diffusion journalière de 141µg de Busérelina par jour. De plus, une injection intramusculaire de 100µg de l'antagoniste a été réalisée le jour de la pose des pompes.

Les endoscopies, la pose et le changement des éponges de progestagène ne changent pas par rapport aux deux premières expériences.



Tableau 16: planning superovulation et transfert d'embryons Mai 2004

PLANNING MOET MAI 2004															
Lot	Groupe FSH à fortes doses					Groupe FSH à doses normales					Groupe Témoin				
N°SANITEL	7261	7168	7264	7263	7263	3086	7298	7276	7232	7223	1814	3390	3346	3102	3124
N°expérience	1	2	4	5	6	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Lun 03 mai	PS					PS					PS				
Mar 04 mai	PS + Endoscopie 1					PS + Endoscopie 1					PS + Endoscopie 1				
Mer 05 mai	PS + Mise à jeun					PS + Mise à jeun					PS				
Jeu 06 mai	PS + Pose des pompes buséréline + injection buséréline					PS + Pose des pompes buséréline + injection buséréline					PS				
Ven 07 mai	PS					PS					PS				
Sam 08 mai															
Dim 09 mai											Mise à jeun				
Lun 10 mai	PS + Pose des éponges					PS + Pose des éponges					PS + Pose des éponges				Pose des éponges
Mar 11 mai	PS					PS					PS				
Jeu 12 mai	PS					PS					PS				
Mer 13 mai	PS					PS					PS				
Ven 14 mai	PS					PS					PS				
Sam 15 mai															
Dim 16 mai	PS + Changer les éponges					PS + Changer les éponges					PS + Changer les éponges				
Lun 17 mai	Mise à jeun					Mise à jeun					Mise à jeun				
Mar 18 mai	PS + Endoscopie 2					PS + Endoscopie 2					PS + Endoscopie 2				
Mer 19 mai	Retrait des pompes					Retrait des pompes					Retrait des pompes				
Jeu 20 mai	PS + FSH (7+7)					PS + FSH (6+6)					PS + FSH (6+6)				
Ven 21 mai	PS + FSH (6+6)					PS + FSH (5+5)					PS + FSH (5+5)				
Sam 22 mai	PS + FSH (4+4)					PS + FSH (3+3)					PS + FSH (3+3)				
Dim 23 mai	PS + Retrait des éponges à 0h + FSH (3+3) LH (0,06+0,09)					PS + Retrait des éponges à 0h + FSH (2+2) LH (0,06+0,09)					PS + Retrait des éponges à 0h + FSH (2+2) LH (0,06+0,09)				
Lun 24 mai	PS + LH 3 en IV à 16h et mise à jeun					PS + LH 3 en IV à 16h et mise à jeun					PS + LH 3 en IV à 16h et mise à jeun				
Mar 25 mai	PS + Endoscopie 3 + IA IU 12h					PS + Endoscopie 3 + IA IU 12h					PS + Endoscopie 3 + IA IU 12h				
Mer 26 mai															
Jeu 27 mai															
Ven 28 mai															
Sam 29 mai															
Dim 30 mai	Mise à jeun					Mise à jeun					Mise à jeun				
Lun 31 mai	Fin PS + Endoscopie 4(CJ)+ Collecte et transfert embryons					Fin PS + Endoscopie 4(CJ)+ Collecte et transfert embryons					Fin PS + Endoscopie 4(CJ)+ Collecte et transfert embryons				
Mar 01 juin															

L'insémination artificielle, la collecte et le transfert d'embryons par contre sont essayés lors de cette dernière expérience. L'insémination artificielle se déroule comme décrit dans la première expérience, du sperme frais ainsi que du sperme congelé sont utilisés. La collecte des embryons est réalisée par laparoscopie. Aucun embryon n'ayant été récolté, il n'y a pas eu de transfert.

Les 15 animaux utilisés pour cette expérience sont répartis en 3 groupes de 5 :

- Le premier groupe reçoit un traitement à la Buséréline administrée par mini pompes à raison de 141µg de Buséréline/jour durant 14 jours. Les pompes étant nouvelles, il n'est pas nécessaire de les changer. Elles reçoivent en outre un traitement FSH en doses décroissantes comme dans les expériences précédentes, mais les doses de l'hormone folliculo-stimulante sont augmentées, à savoir : 2×7UA ; 2×6UA ; 2×4UA ; 2×3UA. Le protocole LH reste inchangé.
- Le deuxième groupe est soumis au même traitement de blocage de l'hypophyse que le premier. Seules varient les doses de FSH administrées qui sont les mêmes que dans les deux premières expériences, à savoir : 2×6UA ; 2×5UA ; 2×3UA ; 2×2UA. Le protocole LH reste encore une fois inchangé.
- Le troisième groupe quant à lui ne reçoit pas de traitement antagoniste de la GnRH, il reçoit le même traitement superovulatoire que le deuxième groupe. Ce sera le groupe témoin

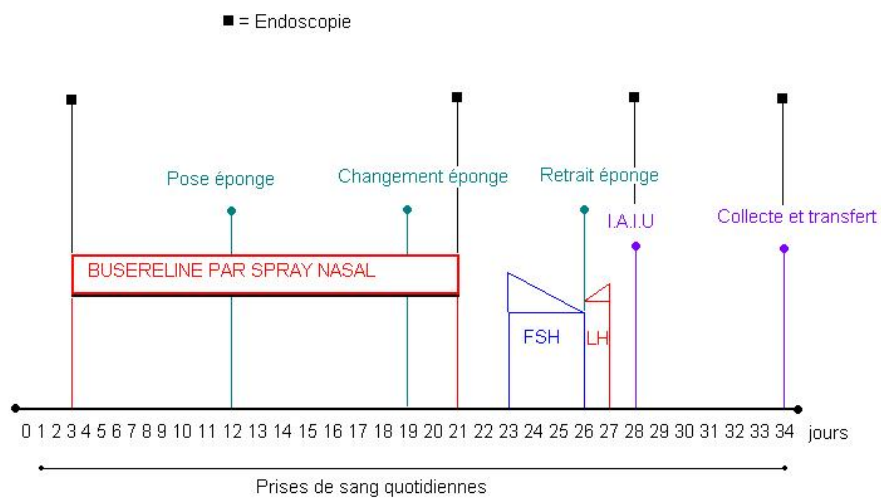
Des prises de sang sont réalisées sur tous les animaux les jours clés de l'expérience.

Le tableau 15 illustre le planning de cette troisième et dernière expérience.

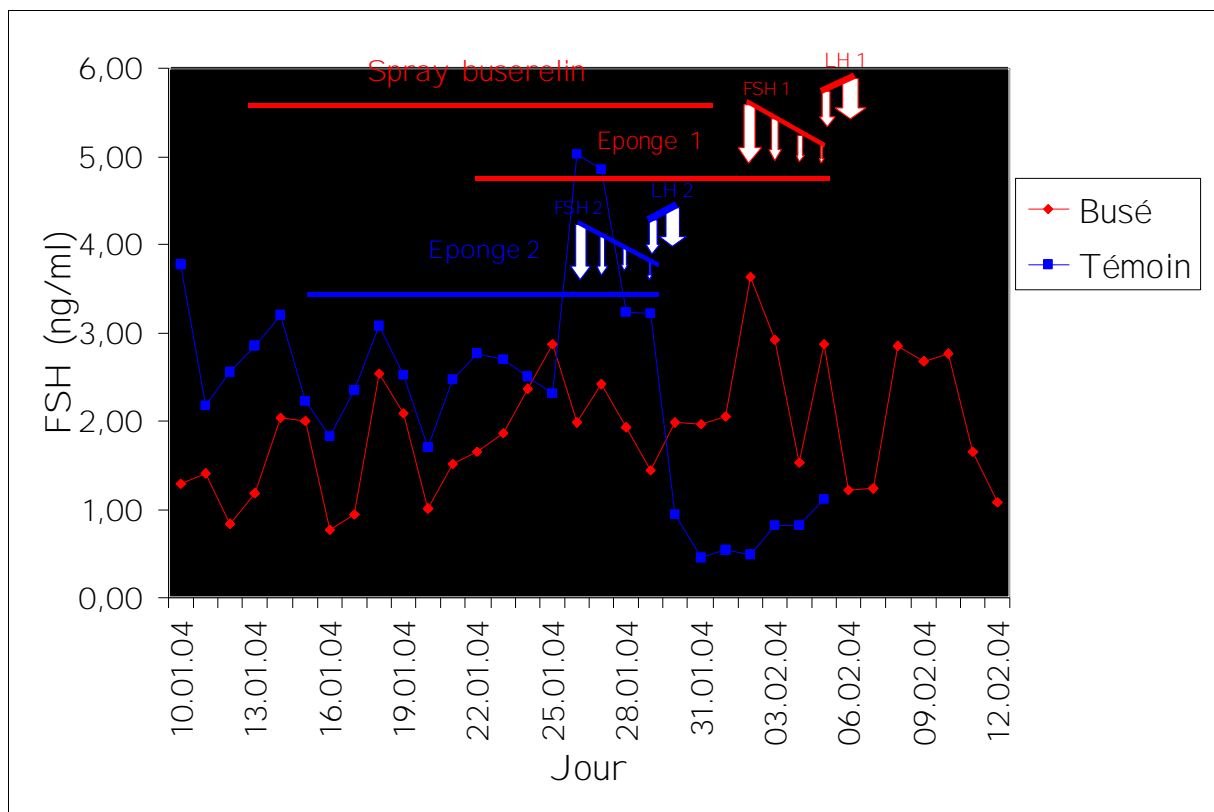
Lors des endoscopies pratiquées au cours des trois expériences, les follicules, visibles à la surface des ovaires, ont été dénombrés et classés selon leur taille. Deux classes de taille ont été distinguées : les gros follicules (GF) ou follicules d'un diamètre supérieur ou égal à 4mm et les petits follicules (PF) ou follicules d'un diamètre inférieur à 4mm.

## Résultats et analyses

*Figure 1: Planning schématisé de la première expérience*



*Figure 2: Evolution de la concentration plasmatique moyenne en FSH des deux groupes*



## 1. Première expérience

### 1.1. Rappel

Pour cette expérience, 10 brebis sont réparties en deux groupes. Le premier reçoit un traitement à la Buséréline destiné à bloquer les sécrétions hypophysaires. Le groupe témoin ne reçoit pas de traitement bloquant mais reçoit le traitement superovulatoire FSH-LH de manière identique au groupe Buséréline.

La figure 1 schématise le planning de cette première expérience

### 1.2. Le blocage hypophysaire

Le but du traitement à la Buséréline, antagoniste de la GnRH, est de bloquer les sécrétions hypophysaires de FSH et de LH. La maturation folliculaire et l'ovulation doivent de ce fait être inhibées. La Buséréline est administrée sous forme de spray nasal 2 fois par jour à raison de 100 µg par administration.

- *Au niveau hormonal :*

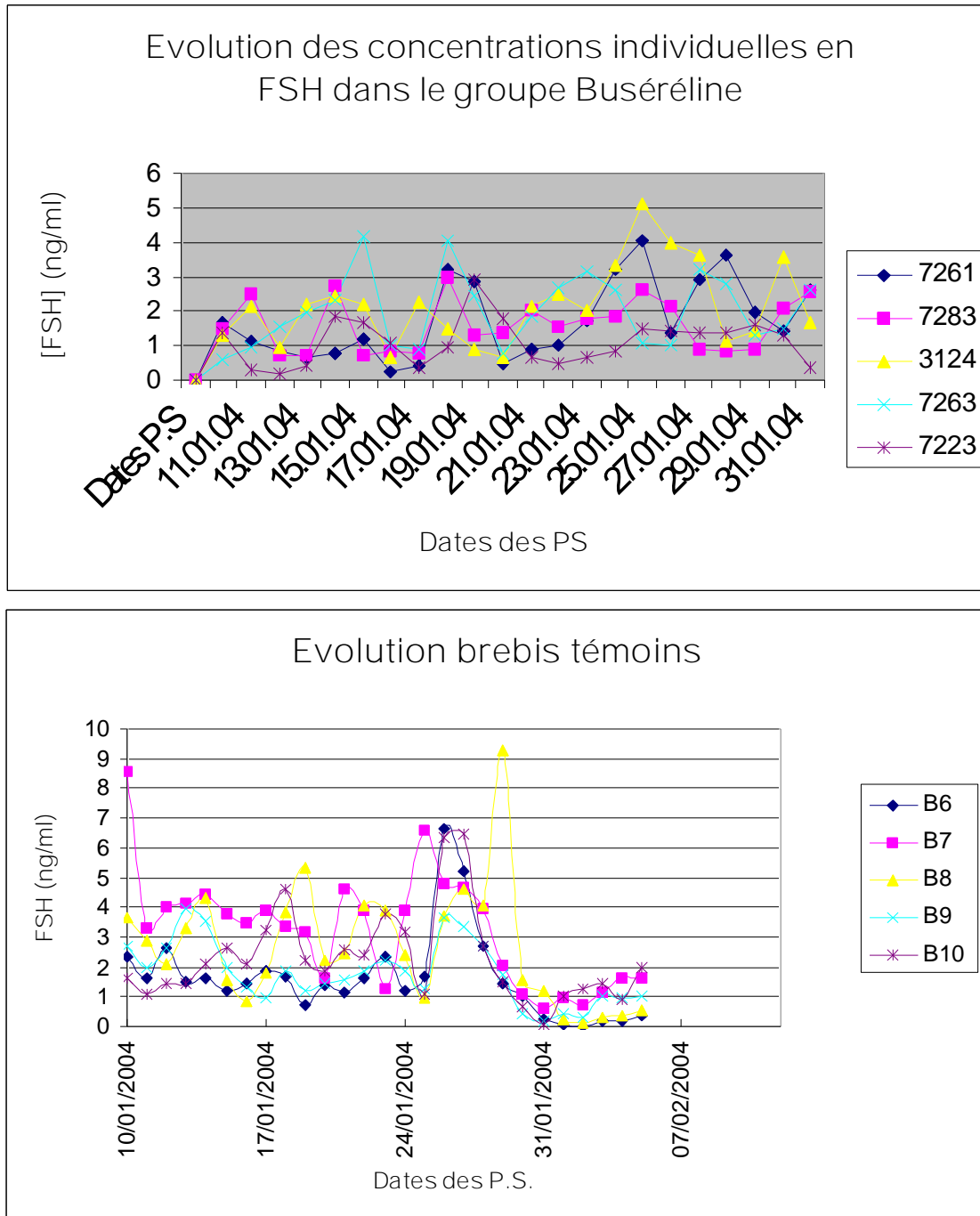
#### La FSH

La figure 2 montre l'évolution de la concentration moyenne de FSH pour le groupe Témoin et pour le groupe Buséréline.

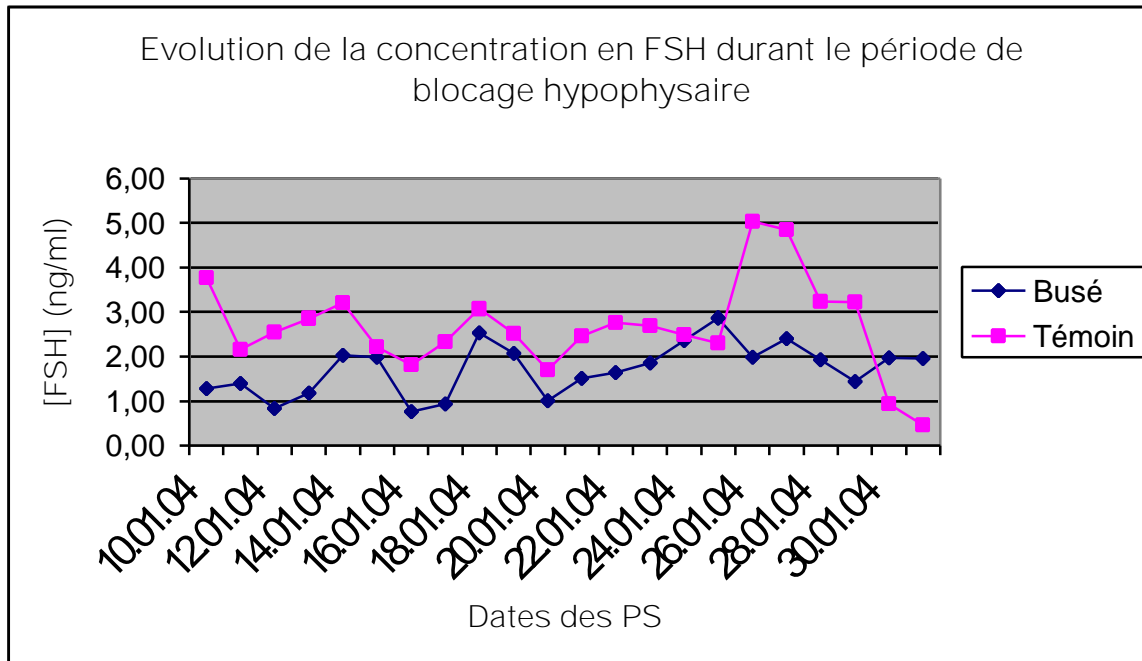
La Buséréline a été administrée aux animaux du premier groupe du 12.01.04 au 31.01.04. Si le blocage avait fonctionné, une diminution significative du taux de FSH devrait être observée. Le taux moyen de FSH devrait être inférieur et le profil de sécrétion devrait montrer une progressive diminution.

Le taux moyen de FSH dans le lot témoin présente une valeur plus importante que celui du lot Buséréline, mais on peut remarquer que cette valeur moyenne était déjà beaucoup plus haute avant le début de tout traitement. Ceci peut s'expliquer par le fait que les brebis à ce moment n'avaient encore reçu aucun traitement de synchronisation et étaient donc à des moments différents du cycle.

*Figure 4 : Evolution des concentrations en FSH des animaux du groupe Buséréline durant la période de blocage hypophysaire (12 au 31.01.04) et du groupe témoin*



*Figure 3 : Evolution comparée des taux moyens de FSH durant la période de blocage Hypophysaire (12 au 31.01.04)*



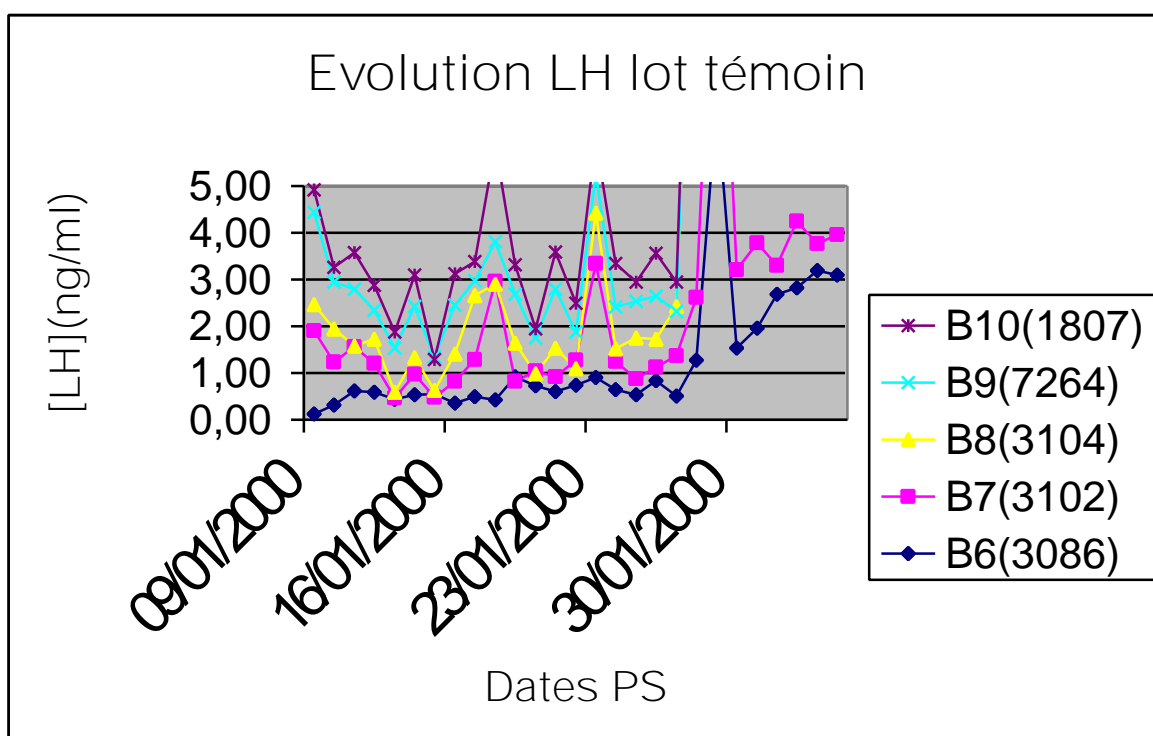
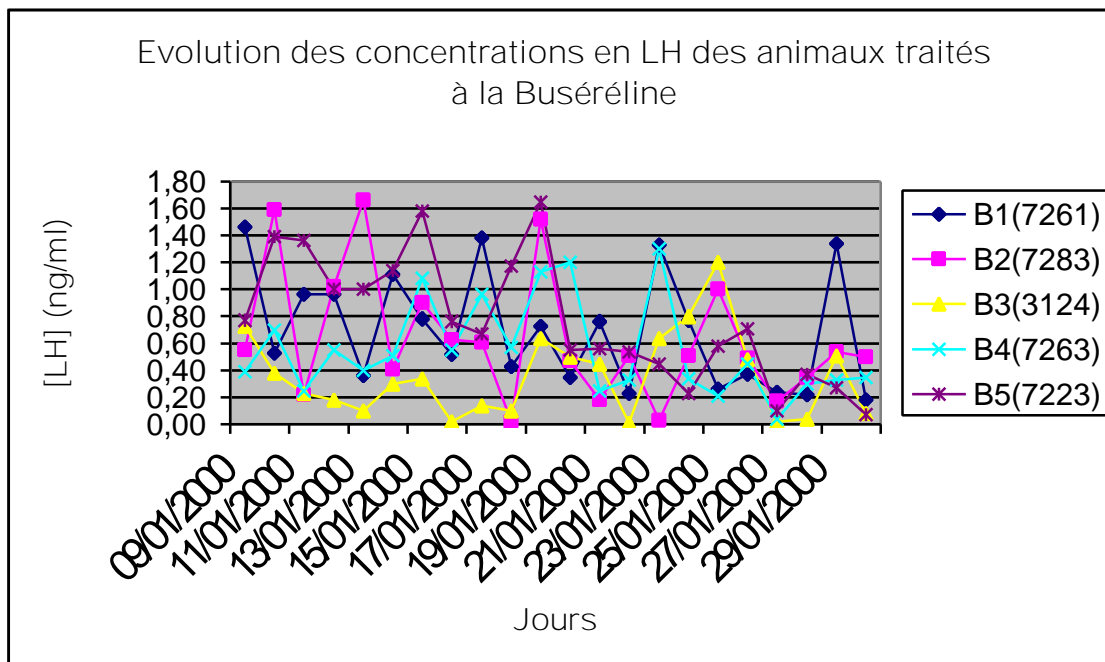
Quant à l'évolution de la concentration de l'hormone folliculo-stimulante au sein du groupe traité à l'agoniste, elle ne montre aucune tendance à la diminution (figure 4) que ce soit en moyenne ou pour le profil individuel d'un animal à l'autre.

La concentration en FSH, qui avec ce traitement devait montrer une tendance à la chute, montre au contraire une fluctuation avec tendance à l'augmentation tout au long du traitement. De plus, la Buséréline en tant qu'agoniste doit normalement provoquer un pic de FSH le jour ou le lendemain du début du traitement (12.01.04), avant saturation des récepteurs. Ce pic inexistant ainsi que l'absence de diminution des taux laissent penser que le traitement bloquant n'a pas fonctionné.

Bien au contraire, les profils de sécrétion individuels montrent chez la plupart des brebis le maintien de vagues de 4 à 6 jours typiques.



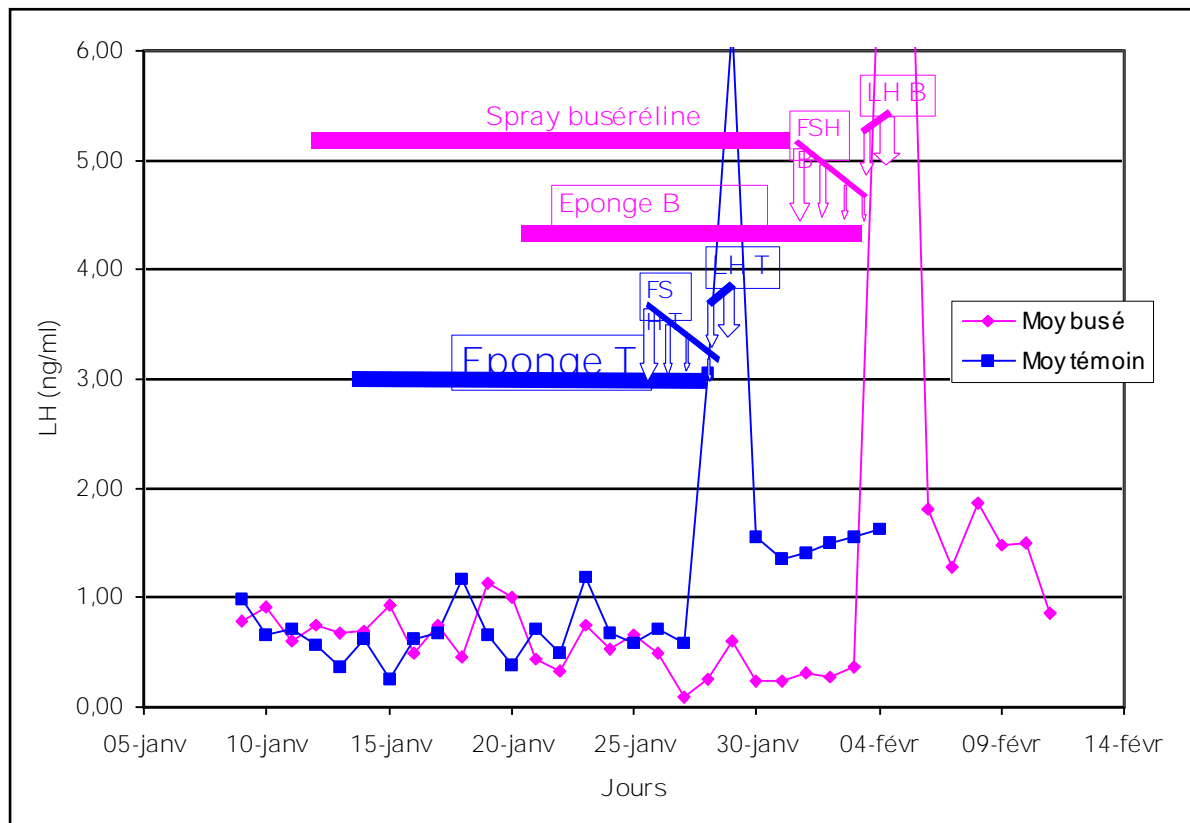
Figure 6 : Evolution des concentrations individuelles en LH des brebis traitées à la Buséréline et des brebis témoins durant la période de blocage hypophysaire



## La LH

La figure 5 montre l'évolution de la concentration moyenne en LH pour le groupe Témoin et pour le groupe Buséreléline, ainsi que les différents traitements appliqués.

*Figure 5 : Evolution de la concentration plasmatique moyenne en LH des deux groupes*



Par rapport au groupe témoin, aucune différence significative n'est observée mais les traitements progestatifs ne commençant pas en même temps, il est plus pertinent d'analyser les résultats au sein du groupe Buséreléline.

La figure 6 montre l'évolution des concentrations individuelles en LH des brebis traitées à la Buséreléline et des témoins durant la période de blocage hypophysaire. On peut observer chez certains animaux une diminution des taux de LH (B3) au début, mais la baisse du taux ne persiste pas et des petits pics apparaissent après quelques jours, signe que cette diminution résulte des variations physiologiques du taux de LH et non d'une inhibition des sécrétions hypophysaires. En général, les taux restent fluctuants, comme ceux observés physiologiquement, chez les brebis non traitées (témoin figure 6)

*Tableau 17: Résultats de la première expérience au niveau ovarien (1-5 : groupe Buséréline, 6-10 : groupe témoin)*

Résultats		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Endoscopie 1 (départ)	GF	2	4	3	4	1	4	1	3	2	2
	MF	7	8	4	10	15	10	6	15	9	15
	CJ	1	1	1	1	0	1	1	1	1	...
Endoscopie 2 (après blocage)	GF	7	1	4	9	7	1	3	2	2	6
	MF	24	8	8	10	10	16	17	22	15	18
	CJ	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1
Endoscopie 3 (stimulation)	Fol. préOvul	14	3	4	16	5	9	13	18	14	9
	MF	15	6	9		10					
Endoscopie 4 (Taux Ovulation)	CJ	0	0	2	0	6	10	9	14	9	6
	GF										
	MF										

GF : Gros follicules ( $\geq 4\text{mm}$ )

MF : Moyens et petits follicules ( $< 4\text{mm}$ )

CJ : Corps jaunes

Fol. Préovul : Follicules préovulatoires

- *Au niveau ovarien*

Le tableau 17 reprend les réponses ovariennes observées durant toute l'expérience.

*Tableau 18: Moyennes du nombre de GF, MF et CJ sur les ovaires des brebis*

		Busé	Témoin
Endo 1	GF	$2,8 \pm 1,3$	$2,4 \pm 1,1$
	PF	$8,8 \pm 4,1$	$11,0 \pm 3,9$
	CJ	$0,8 \pm 0,4$	$1,0 \pm 0,0$
Endo 2	GF	$5,6 \pm 3,1$	$2,8 \pm 1,9$
	PF	$12,0 \pm 6,8$	$17,6 \pm 2,7$
	CJ	$0,4 \pm 0,5$	$0,4 \pm 0,5$

Au niveau ovarien, si le nombre de gros follicules est assez identique lors de la première endoscopie, on voit qu'après blocage (endoscopie 2), on observe une augmentation significative ( $P < 0.05$ ) du nombre de gros follicules. En effet, le groupe Busérelina a 2 fois plus de gros follicules sur ses ovaires alors que la Busérelina est sensée empêcher la sécrétion de FSH et donc la maturation folliculaire. De plus, le nombre de petits follicules après blocage est moins élevé que le nombre de petits follicules dans le groupe témoin. Ce qu'on pouvait observer au niveau hormonal se confirme au niveau ovarien : le traitement à la Busérelina n'aurait pas fonctionné dans cette première expérience. Une autre observation qui va dans ce sens est la présence d'un corps jaune à la deuxième endoscopie chez les brebis 1 et 4 après 19 jours de traitement à la Busérelina.

### 1.3. La stimulation ovarienne

Après l'hypophysectomie chimique, les gonadotrophines exogènes sont administrées en doses décroissantes afin d'induire la superovulation chez les animaux.

- *Au niveau hormonal :*

Comme nous pouvons le voir sur les graphes 2 et 5, tant la FSH que la LH injectées en intramusculaire sont bien arrivées dans le sang. Les animaux présentent des pics de FSH et de LH après injection de ces gonadotrophines.

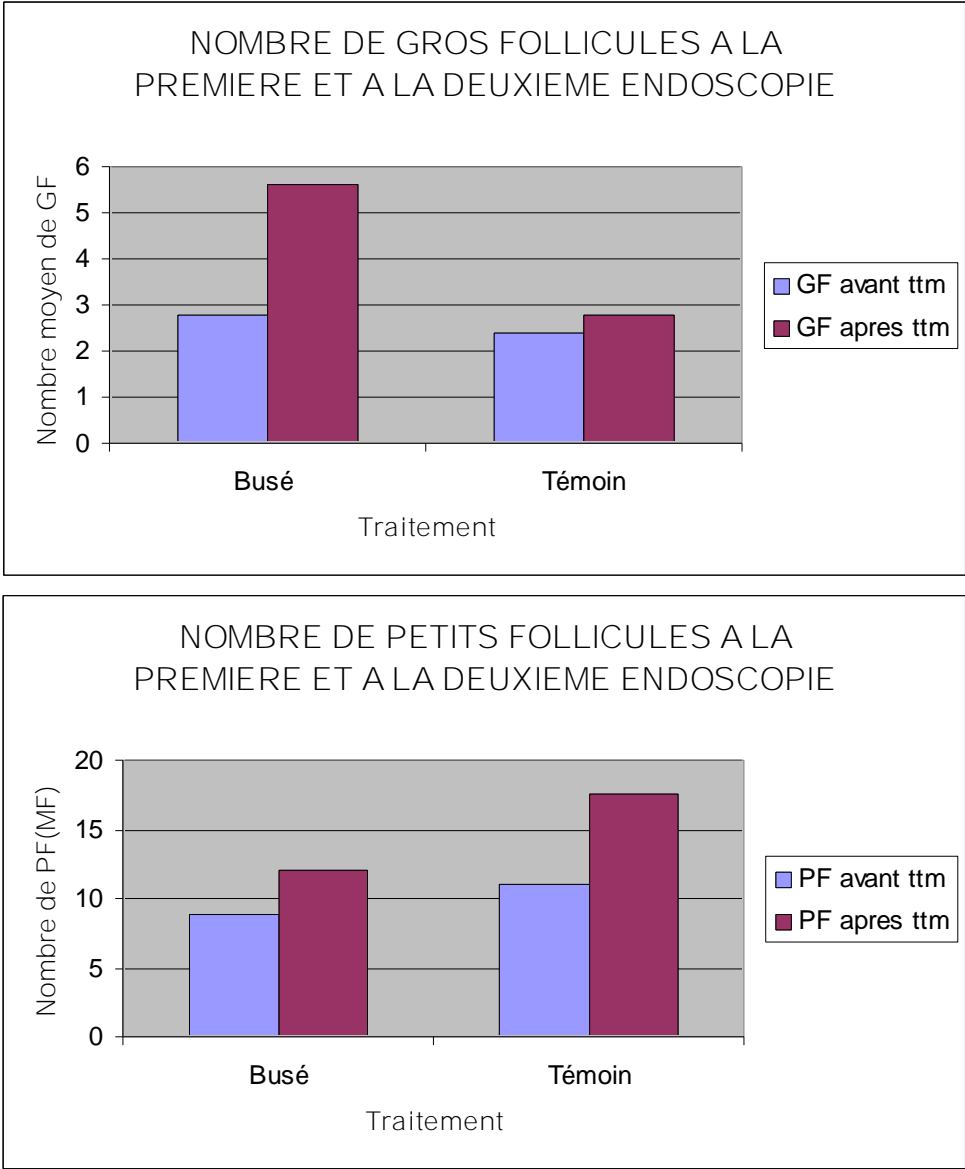
- *Au niveau ovarien :*

Les résultats de la stimulation ovarienne sont les suivants :

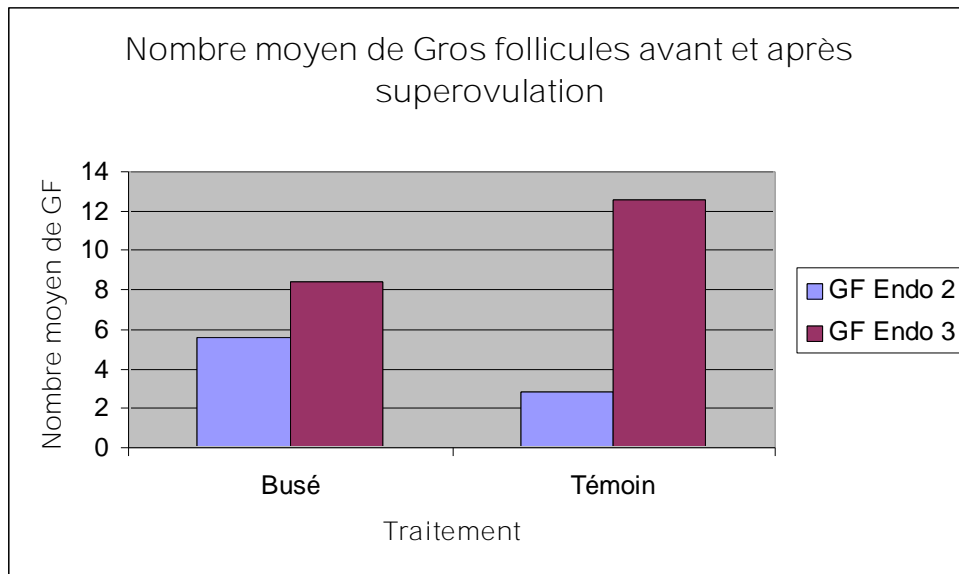
*Tableau 19: Nombre moyen de gros follicules et de follicules pré-ovulatoires avant et après traitement superovulatoire et taux d'ovulation observés après traitement*

	Busé	Témoin
GF Endo 2	$5.6 \pm 3.1$	$2.8 \pm 1.9$
GF Endo 3	$8.4 \pm 6.1$	$12.6 \pm 3.8$
T.O.	$2.7 \pm 3.1$	$9.6 \pm 2.9$

Figure 8 : Comparaison du nombre de gros et petits follicules à la première et à la deuxième endoscopie



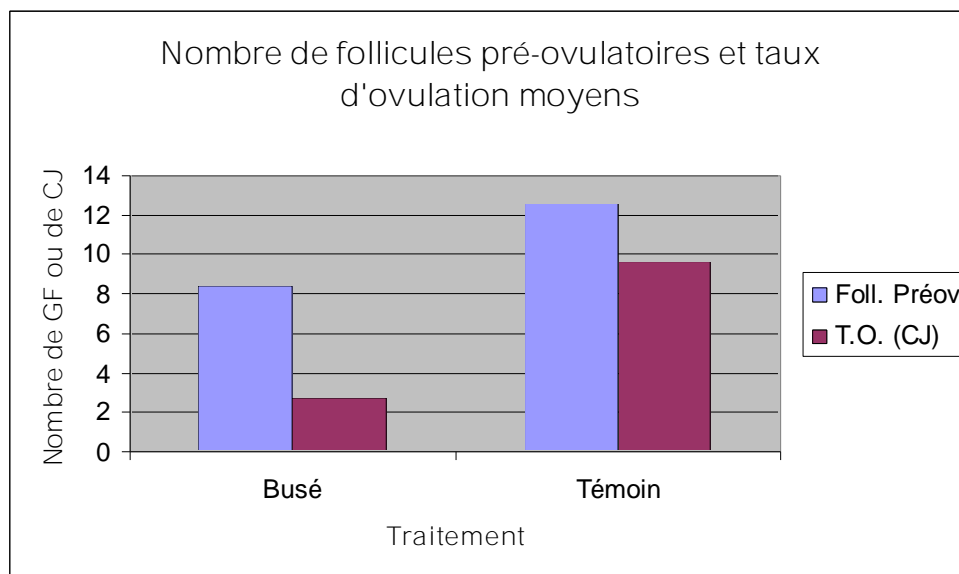
*Figure 9 : Nombre moyen de gros follicules avant et après traitement de superovulation*



L'ovaire a répondu significativement au traitement de superovulation, et beaucoup mieux pour le groupe n'ayant pas reçu de traitement bloquant préalable ( $P < 0.05$ ).

Un pool important de follicules est arrivé à maturation finale, mais comme nous le montrent ces résultats, le taux d'ovulation (nombre de corps jaunes observés lors de la collecte d'embryons) dans le groupe Busé est anormalement faible par rapport au nombre de follicules pré-ovulatoires présents à la surface des ovaires 6 jours avant. Le taux d'ovulation moyen de 9,6 dans le groupe témoin est par contre assez bon.

*Figure 10 : Nombre moyen de follicules pré-ovulatoires et taux d'ovulation moyen*



#### 1.4. La collecte et le transfert embryonnaires

Après insémination artificielle, les embryons seront collectés chez les brebis présentant un taux d'ovulation suffisant. Les résultats de cette collecte sont deux embryons récoltés chez la brebis 7 (3102), tous deux en bon état, et un embryon récolté chez la brebis 8, lui aussi en parfait état. Ces 3 embryons seront transplantés chez 2 receveuses :

- Les 2 embryons de la brebis 7 seront transférés dans la receveuse 7241. Celle-ci présentant un corps jaune de chaque côté, nous pouvions choisir la corne dans laquelle est injecté l'embryon. Nous avons transféré celui-ci aux 9/10èmes de la corne utérine droite.
- L'embryon venant de la brebis 8 est transféré dans la receveuse 7236. La receveuse présente 2 corps jaunes à droite mais aucun à gauche, l'embryon est donc injecté dans la corne gauche.

Des échographies ultérieures ont montré que les 2 femelles receveuses étaient gestantes. Elles ont mené une grossesse sans problèmes et sont arrivées à terme.

#### 1.4. Conclusions partielles

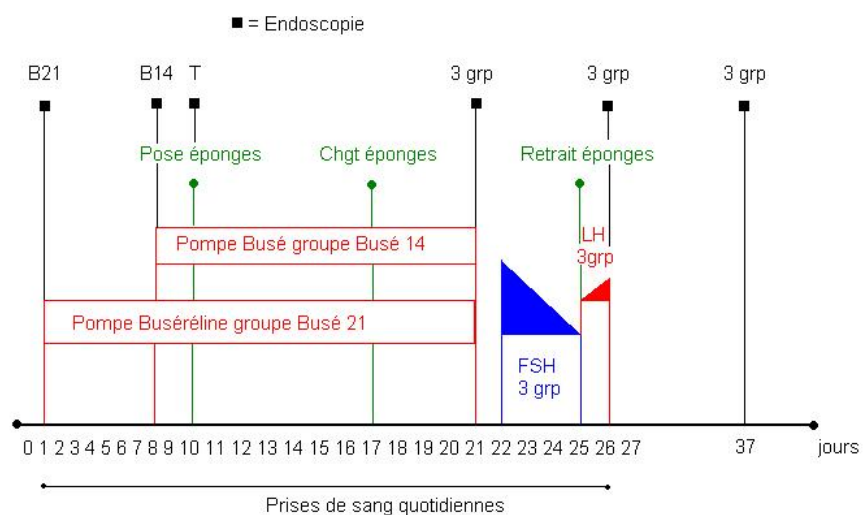
Il paraît évident au vu de cette première expérience que le blocage hypophysaire par un agoniste de la GnRH, la Buséréline, n'a pas fonctionné. Les doses de  $2 \times 100\mu\text{g/jour}$  étaient peut-être insuffisantes, mais la raison la plus probable à cette inefficacité du traitement semble être le mode d'administration. En effet le spray nasal, conçu pour des femmes, semble être inadapté à l'animal qu'il est difficile d'obliger à inhaler au moment de l'injection. Une bonne partie de la dose semble être perdue et ne se retrouve pas dans le système respiratoire de l'animal.

En ce qui concerne la stimulation ovarienne, les bons résultats obtenus dans le groupe témoin avec un taux d'ovulation moyen proche de 10 ovulations par brebis confirment l'efficacité de ce traitement. Le groupe Buséréline par contre semble avoir un taux d'atrésie folliculaire assez élevé, passant d'un nombre moyen de follicules de 8,4 à un taux d'ovulation de 2,7. Ces résultats sont en discordance avec les taux plasmatiques de LH qui montrent un pic de LH pré-ovulatoire très important. Le traitement semble avoir perturbé le contrôle hypothalamo-hypophysaire de l'ovaire.

Beaucoup d'embryons semblent avoir échappé à la récolte. Cette perte d'embryons est sans aucun doute à mettre en relation avec le manque d'étanchéité du système de collecte. Sur 40 ml de liquide de récolte injectés dans l'utérus de la femelle donneuse, à peine la moitié est revenue dans le tube receveur. Beaucoup d'embryons sont partis avec le milieu de récolte dans l'abdomen de l'animal par les différentes fuites du système de collecte.

La technique de transfert embryonnaire semble bien maîtrisée puisque 100% des embryons transférés sont arrivés à terme dans la receveuse.

*Figure 11: Planning schématisé de la deuxième expérience*



Légende :

- B21 : Groupe Buséréline 21 jours
- B14 : Groupe Buséréline 14 jours
- T : Groupe témoin
- 3 grp : traitement appliqué aux trois groupes



## 2. Deuxième expérience

### 2.1. Rappel

Au vu des résultats de la première expérience, il a été décidé de mener une expérience de superovulation stricte sans insémination. Le but de cette expérience est d'affiner le protocole de blocage hypophysaire à la Busérelina. La stimulation FSH-LH ayant donné des résultats corrects dans la première expérience, il reste le même dans la deuxième.

Les 15 brebis sont réparties en 3 groupes de 5. La figure 11 schématise l'expérience.

### 2.2. Le blocage hypophysaire

- *Au niveau hormonal :*

#### La FSH

Les graphiques 12 à 15 montrent l'évolution des concentrations plasmatiques moyennes et individuelles en FSH durant l'expérience.

Suite à ces observations, les analyses suivantes peuvent être faites :

#### Comparaison au sein des lots traités à la Busérelina

- Dans le groupe Busérelina 21 jours, il n'y a aucune différence significative ( $P > 0,05$ ) dans les taux de FSH entre le début du traitement, le moment du changement des pompes et le moment du retrait des pompes.
- Dans le groupe Busérelina 14 jours, on observe la même absence de différence significative entre les différents instants du traitement que dans le premier groupe.

#### Comparaison entre les groupes

Quelques jours clés ont été choisis pour effectuer des comparaisons dans les taux plasmatiques de FSH entre les différents groupes.

- A la première endoscopie, soit avant traitement Busérelina (30.03.04 pour le lot Busé 21, 11.04.04 pour les Busé 14 et les témoins), il y a une différence significative ( $P < 0,05$ ) entre le groupe Busé 21j et le groupe Busé 14j, et hautement significative ( $P < 0,05$ ) entre le groupe Busé 21j et le groupe témoin. Il n'y a pas de différence significative entre le groupe Busé 14j et le groupe témoin.
- Au moment de la pose des éponges (13 mars), il y a une différence significative ( $P < 0,05$ ) entre le groupe Busé 21j et le groupe Busé 14 j, et entre le groupe Busé 21j et le groupe témoin. Il n'y a pas de différence significative entre le groupe Busé 14j et le groupe témoin.

Figure 12.: Evolution des concentrations moyennes de FSH des différents lots

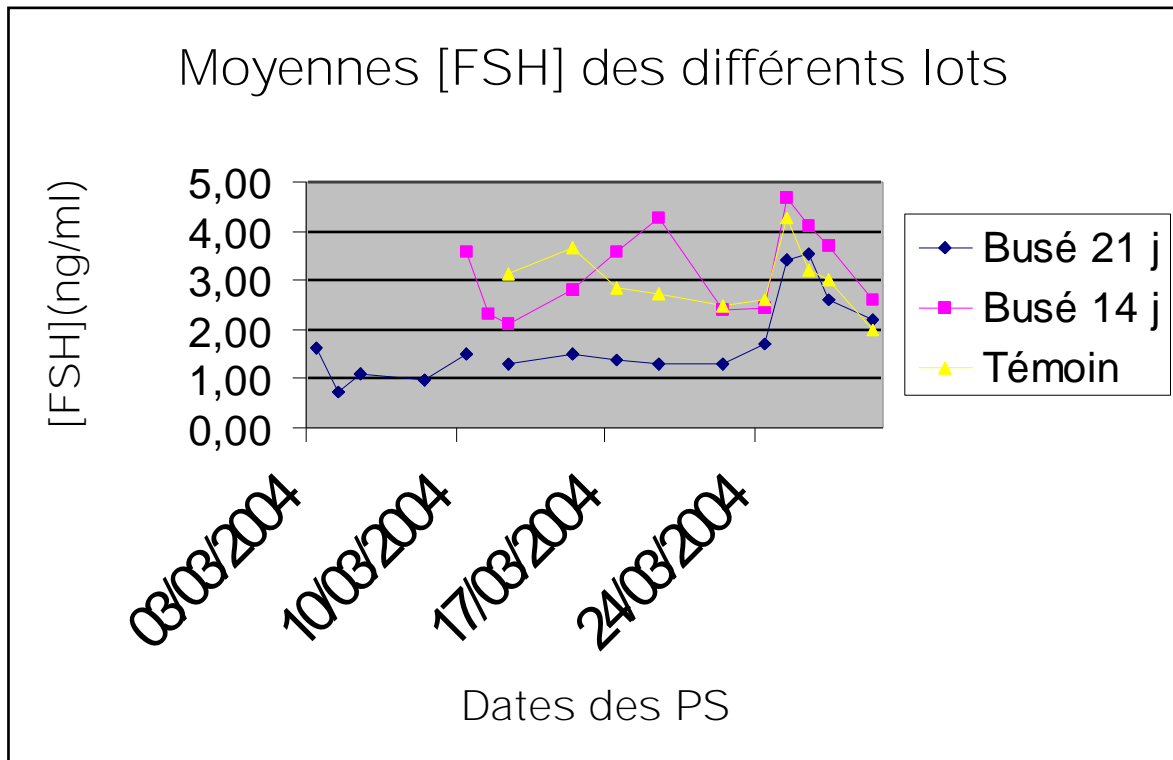


Figure 13.: Evolution des concentrations en FSH du groupe Buséréline 21 jours

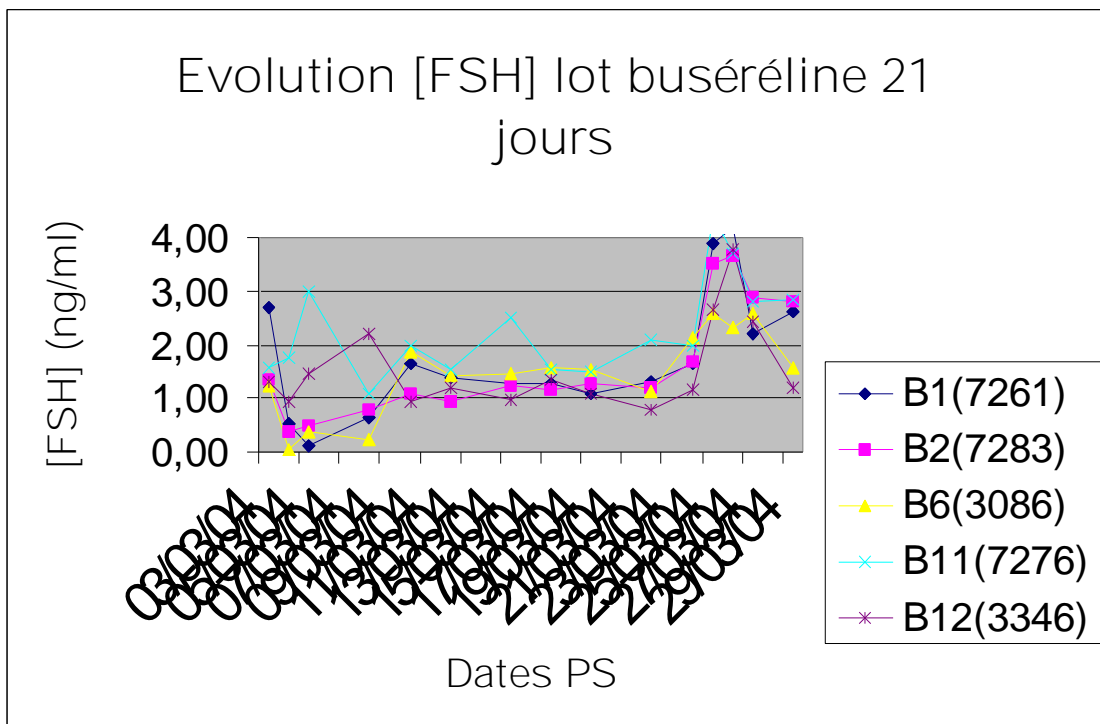


Figure 14 : Evolution des concentrations en FSH du groupe Buséréline 14 jours

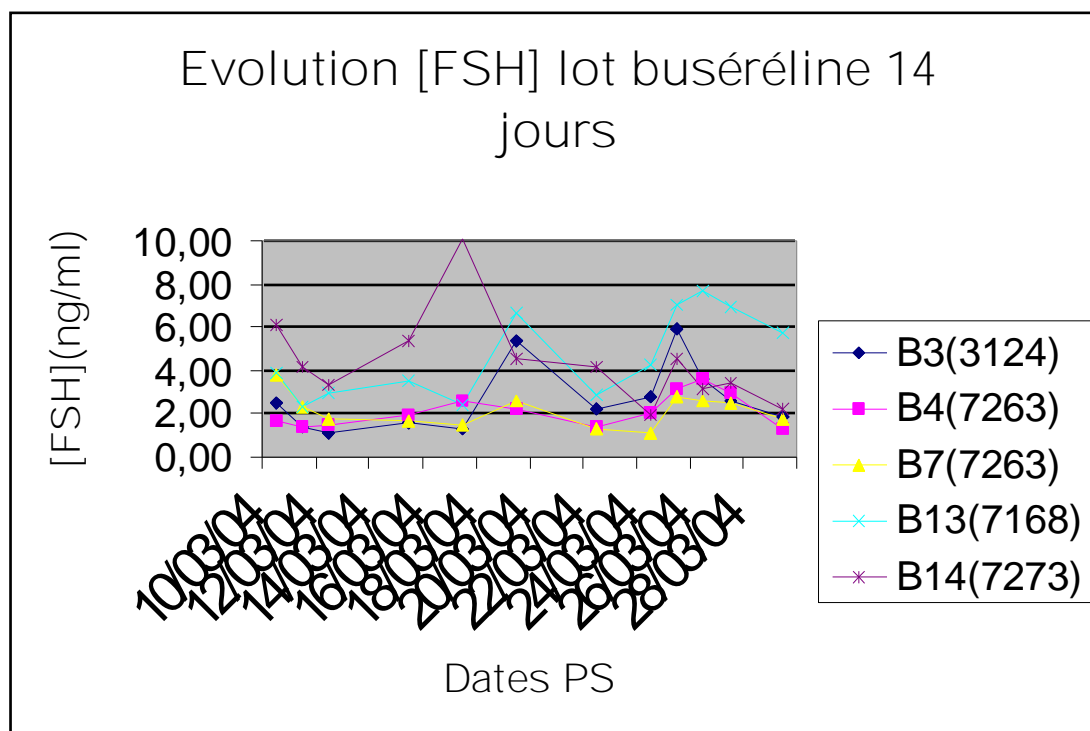


Figure 15 : Evolution des concentrations en FSH du groupe Témoin

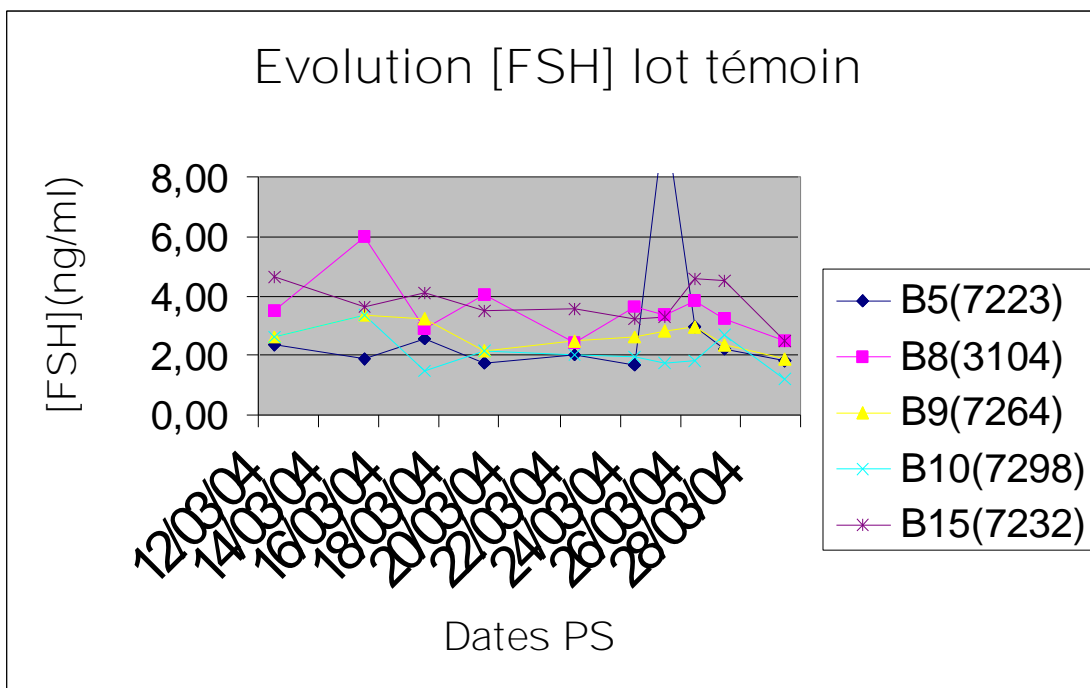


Figure 16 : Evolution des concentrations moyennes en LH des différents lots

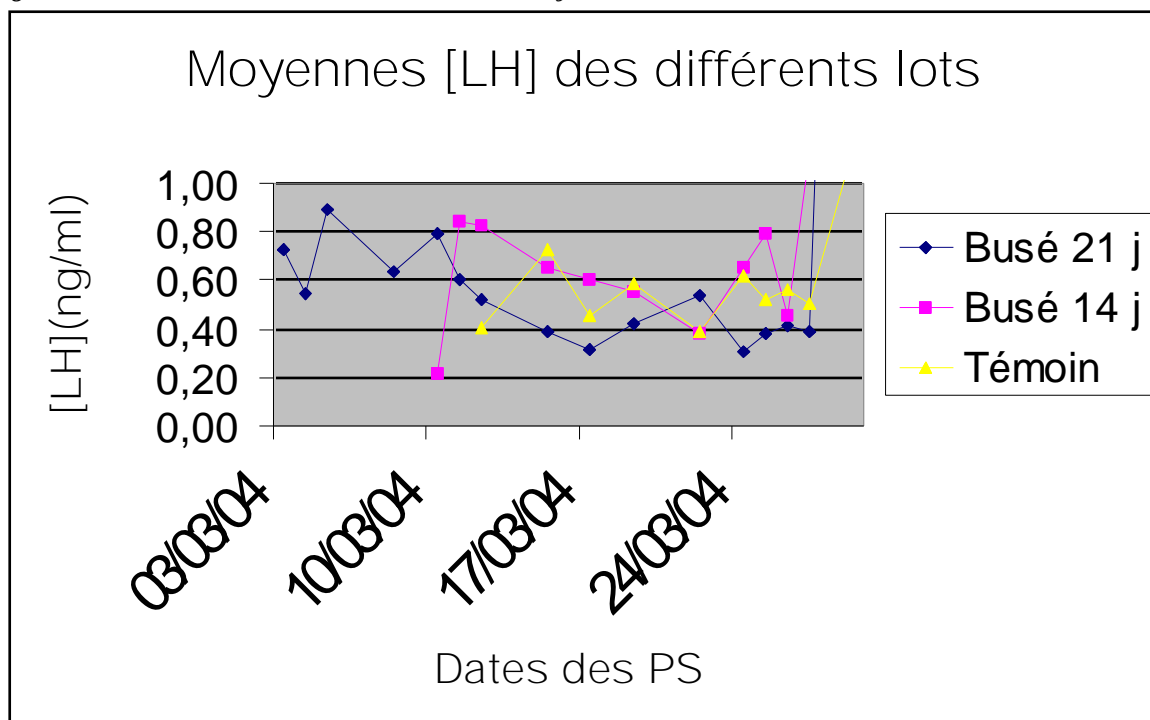


Figure 17 : Evolution des concentrations en LH du groupe Buséréline 21 jours

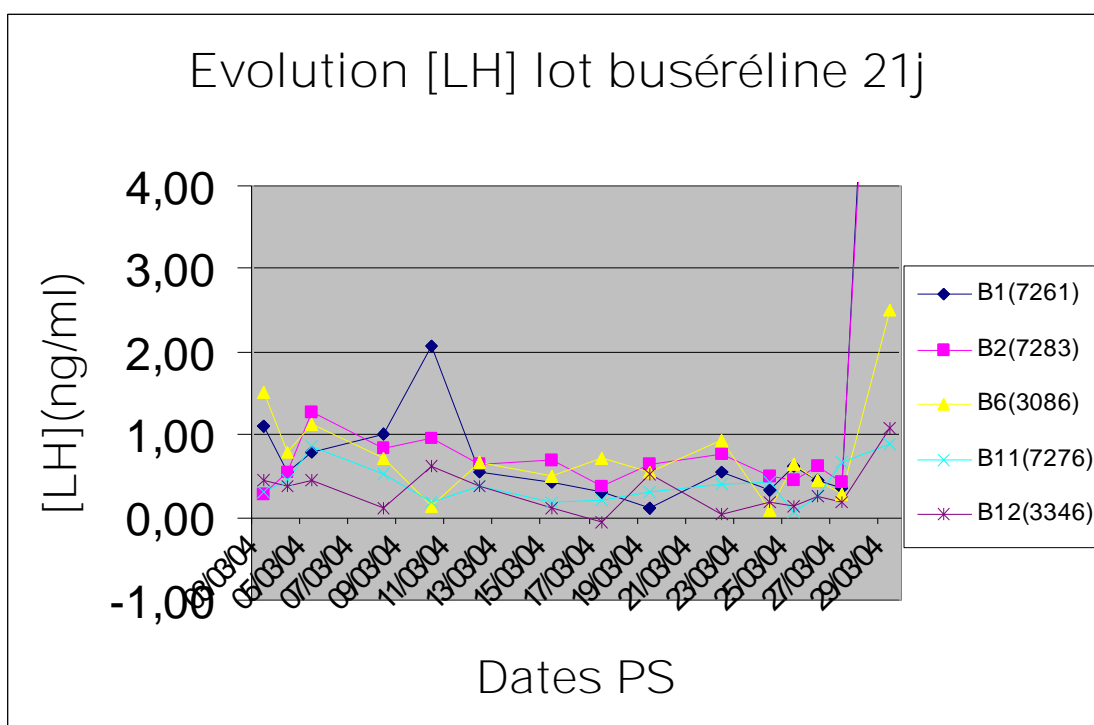


Figure 18: Evolution des concentrations en LH du groupe Buséréline 14 jours

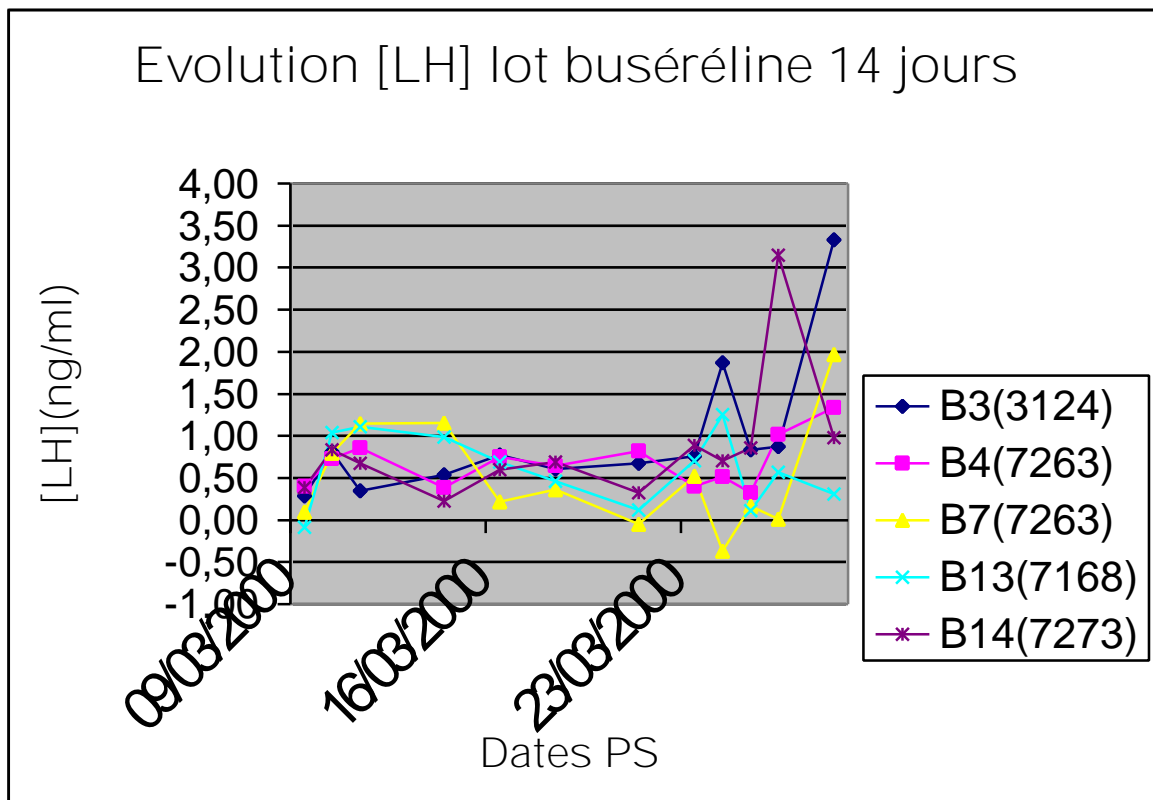
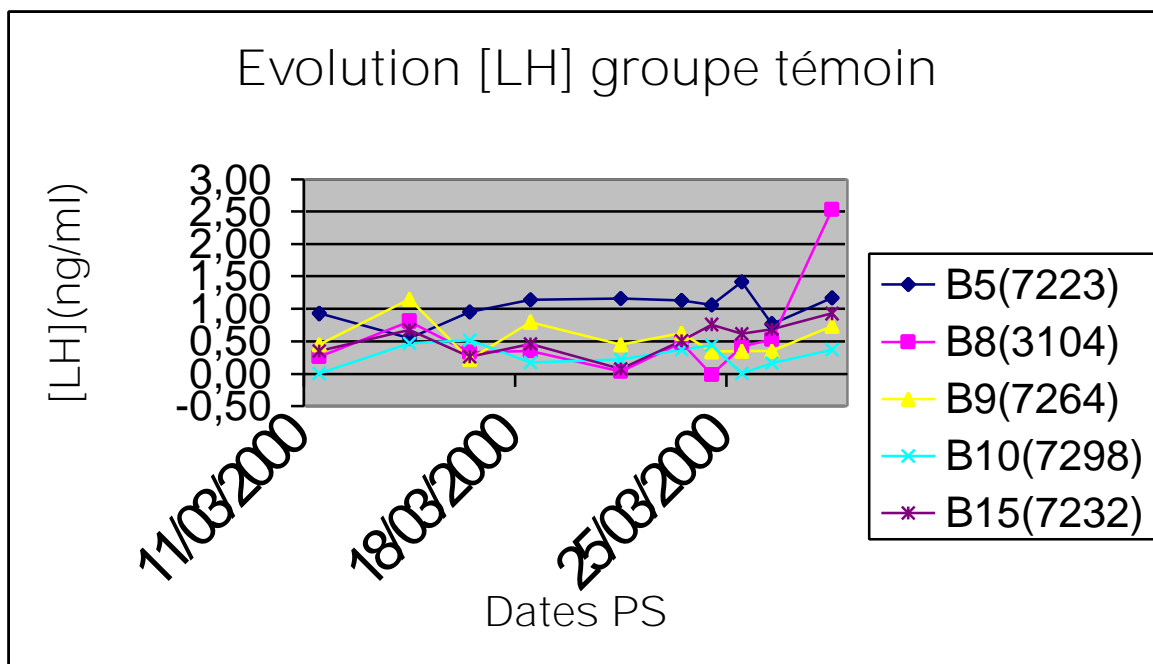


Figure 19: Evolution des concentrations en LH du groupe témoin



- A la fin du traitement Busérelina, il n'y a aucune différence significative entre les différents lots.
- Evolution : Pour la FSH, aucune modification n'apparaît dans le profil au cours du traitement

### La LH

Les graphiques 16 à 19 montrent l'évolution des concentrations plasmatiques moyennes et individuelles de la LH au cours du traitement

Les analyses suivantes découlent de ces observations :

#### Comparaison au sein des lots traités à la Busérelina

- Dans le groupe Busérelina 21 jours, on ne remarque aucune différence significative entre les différents moments du traitement.
- Dans le groupe Busérelina 14 jours, on remarque une différence significative ( $P < 0,05$ ) entre le moment de la pose de la première et de la deuxième pompe ainsi qu'entre le début et la fin du traitement bloquant, mais ces différences sont opposées à celles voulues par ce traitement. Les concentrations en LH sont plus importantes après qu'avant traitement.

#### Comparaison entre les groupes

- Au jour de l'administration de la Busérelina ou au jour équivalent pour les brebis témoins (30.03.04 pour le lot Busé 21, 11.04.04 pour le lot Busé 14 et les témoins), aucune différence significative n'est observée entre les différents lots.
- A la pose des éponges, aucune différence significative n'est observée entre les différents lots.
- A la fin du traitement Busérelina (24mars), on observe une différence significative ( $P < 0,05$ ) entre le groupe Busé 21j et les deux autres groupes.
- Evolution : Dans les deux groupes traités à la Busérelina, une tendance progressive à la diminution des taux de LH apparaît significativement.

### Conclusion partielle

Les dosages des gonadotrophines et leur analyse nous montrent que dans cette deuxième expérience comme dans la première, le blocage hypophysaire n'aurait pas ou peu fonctionné. Même si l'on observe chez les animaux traités une progressive diminution de la sécrétion de LH, les valeurs ne diffèrent pas du lot témoin à la fin du traitement.

*Tableau 20: Ensemble des réponses ovariennes observées durant le deuxième expérience*

		Busé 21 jours					Busé 14 jours					Témoin				
N° SANITEL		7276	3346	7283	7261	3086	7168	7273	7263	3124	3102	3104	7232	7264	7223	7298
N° EXPERIENC		11	12	2	1	6	13	14	4	3	7	8	15	9	5	10
E	CJ						1 CJ	2 CA	1 CA		4 CA	1 CA		1 CA	1 CA	3 CA
N																
D	GF	3	5	2	2		1		7	2	5	3	6	3	2	2
O																
	P&MF	6	10	8	24	4	3	5	12	6	16	14	13	21	11	21
1	(<4mm)															
E	CJ	1 CA	1 CA				1 CA		1 lutéolyse	5 CA	3 CA	1 CA			3 CA	2CA
N																
D	GF	1		4	2			1	9	1			11	6	4	2
O																
	P&MF	8	23	7	22	18	2	10	18	9	23	11	13	10	15	7
2	(<4mm)															
E	CJ						2CA	1CA		4 CA	2 CA					
N																
D	GF	7	9	7	12	7	2	6	13	8	11	9	20	15	18	14
O																
	P&MF	1	12	7	7	14	3	7	5	8	11	3		2		3
3	(<4mm)															

- *Au niveau ovarien*

Le tableau 20 reprend l'ensemble des réponses ovariennes observées lors des endoscopies réalisées durant tout le traitement.

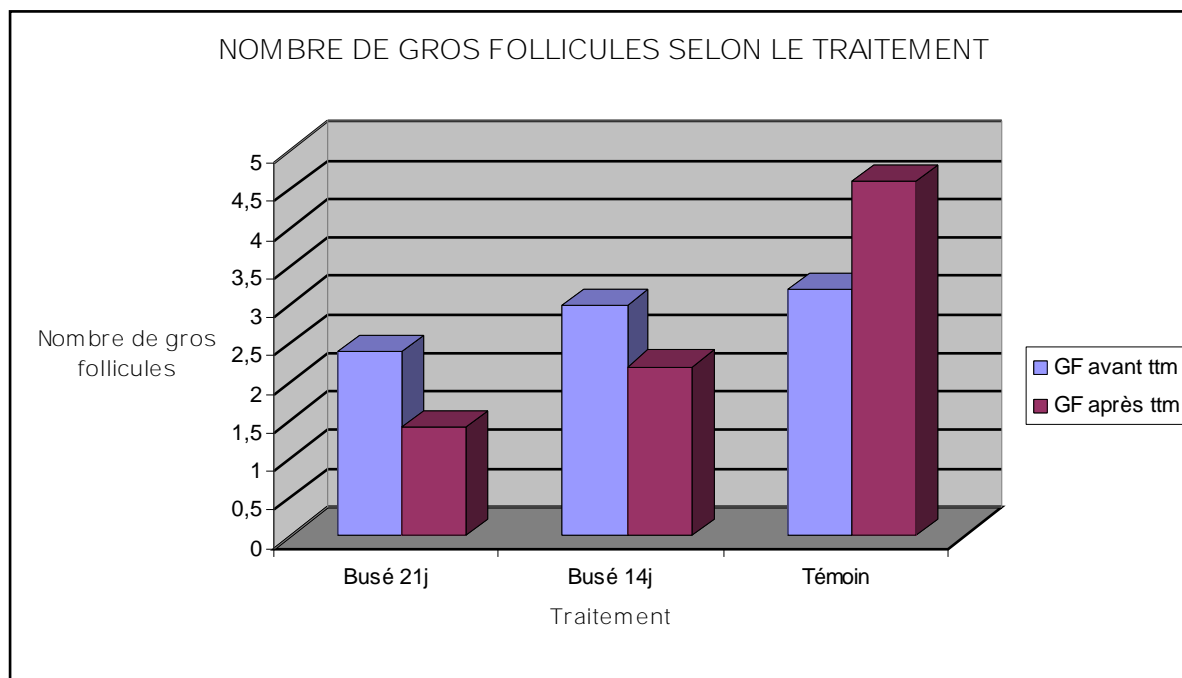
Le tableau ci-dessous reprend les moyennes des nombres de corps jaunes, gros et petits follicules des différents groupes aux différentes endoscopies.

*Tableau 21 : Nombre moyen de gros et petits follicules avant et après traitement à la Buséreléline*

NOMBRE DE GROS FOLLICULES			
	Busé 21j	Busé 14j	Témoin
GF avant ttm	2,4 ± 1,4	3 ± 2,8	3,2 ± 1,6
GF après ttm	1,4 ± 1,3	2,2 ± 4,6	4,6 ± 3,9

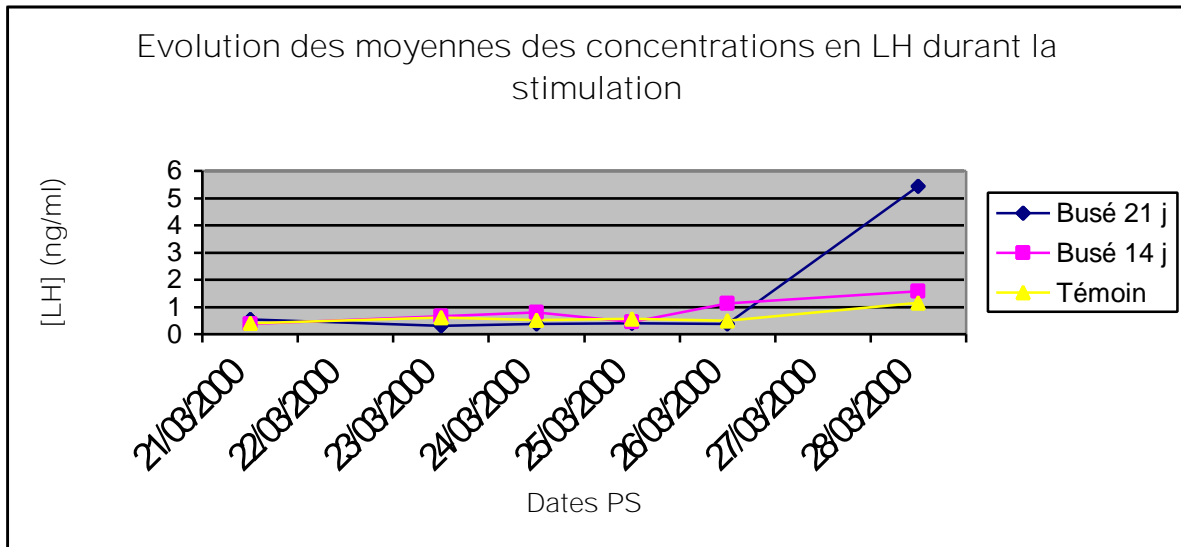
NOMBRE DE PETITS ET MOYENS FOLLICULES			
	Busé 21j	Busé 14j	Témoin
MF avant ttm	10,4 ± 7,9	8,4 ± 5,4	16,0 ± 4,7
MF après ttm	15,6 ± 7,6	12,4 ± 8,2	11,2 ± 3,0

*Figure 20: Nombre moyen de gros follicules avant et après traitement à la Buséreléline*

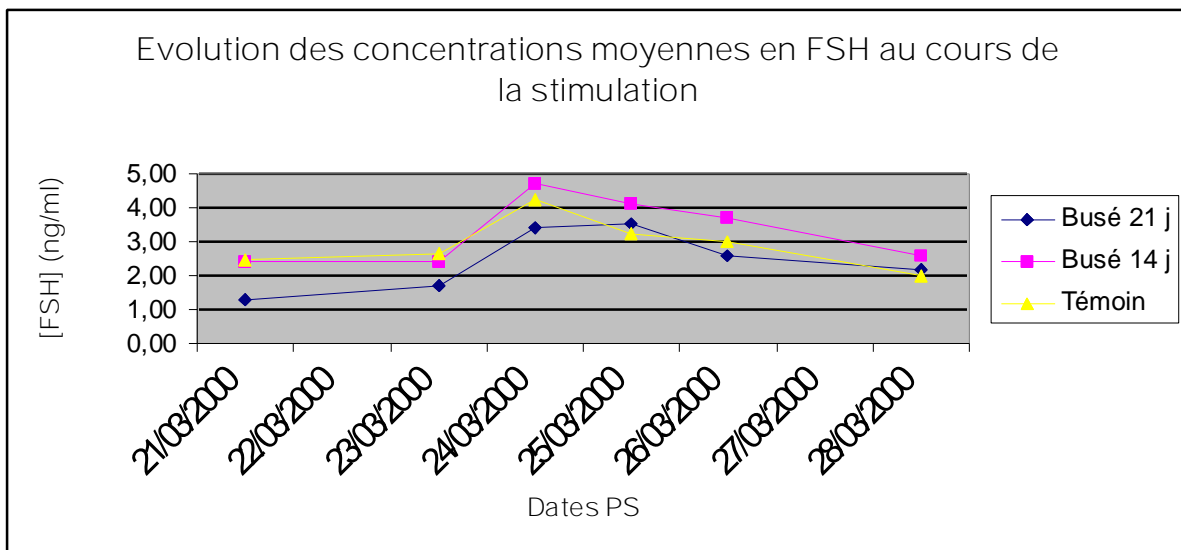




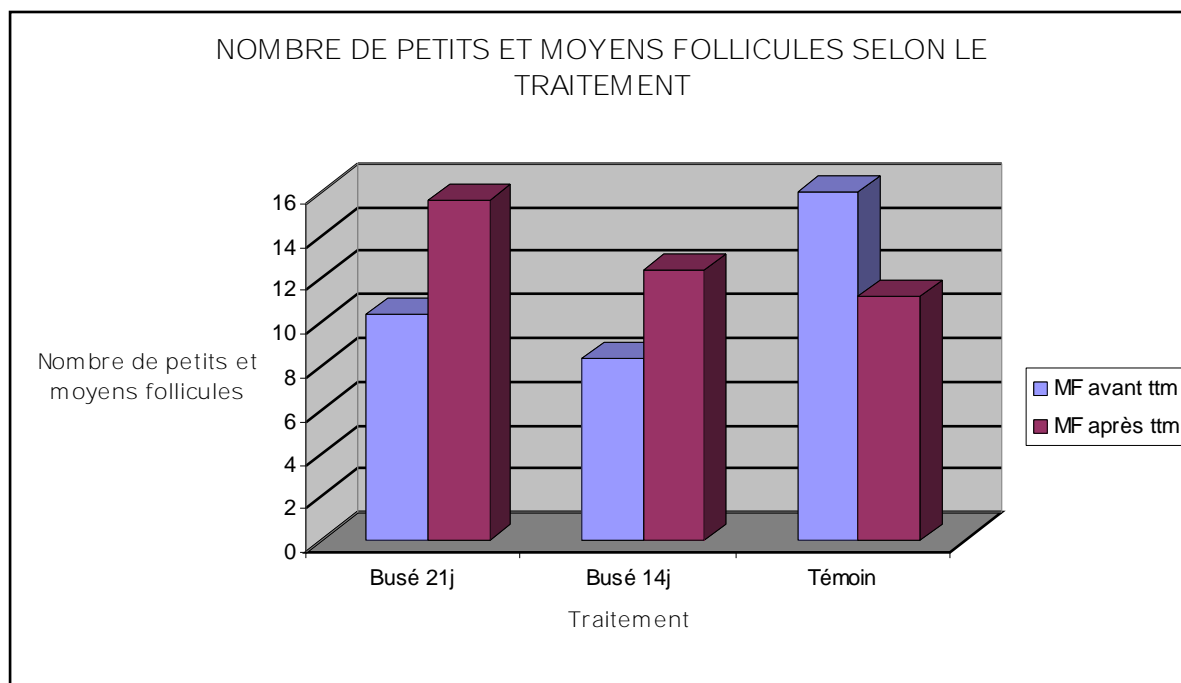
*Figure 22 : Evolution des concentrations plasmatiques moyennes en LH durant la stimulation*



*Figure 23 : Evolution des concentrations plasmatiques moyennes en FSH durant la stimulation*



*Figure 21 : Nombre moyen de petits follicules avant et après traitement à la Buséréline*



Nous pouvons observer dans les groupes traités à la Buséréline une diminution significative ( $P < 0.05$ ) du nombre moyen de gros follicules et une augmentation significative ( $P < 0.05$ ) du nombre de petits follicules. La population de gros follicules augmente dans le groupe témoin alors que la population de petits follicules diminue. La Buséréline aurait donc eu un léger effet bloquant sur l'hypophyse des animaux qui l'ont reçue.

### 2.3. La stimulation ovarienne

- *Au niveau hormonal*

Les graphiques 22 et 23 illustrent l'évolution des concentrations moyennes en LH et en FSH durant le traitement superovulatoire.

Les injections de FSH se font du 24/03/04 au 27/03/04 en doses décroissantes et la LH est administrée les 27/03 et 28/03. On remarque bien l'augmentation des taux plasmatiques de FSH aux dates des injections. Par contre, les taux de LH restent assez bas, sauf dans le groupe Buséréline 21 jours.

Il est à noter que dans cette expérience, les prises de sang ont été effectuées tous les 2 jours à 9 h et que la LH est injectée à 16 h, ce qui rend très faible la chance de percevoir la hausse de la LH plasmatique.

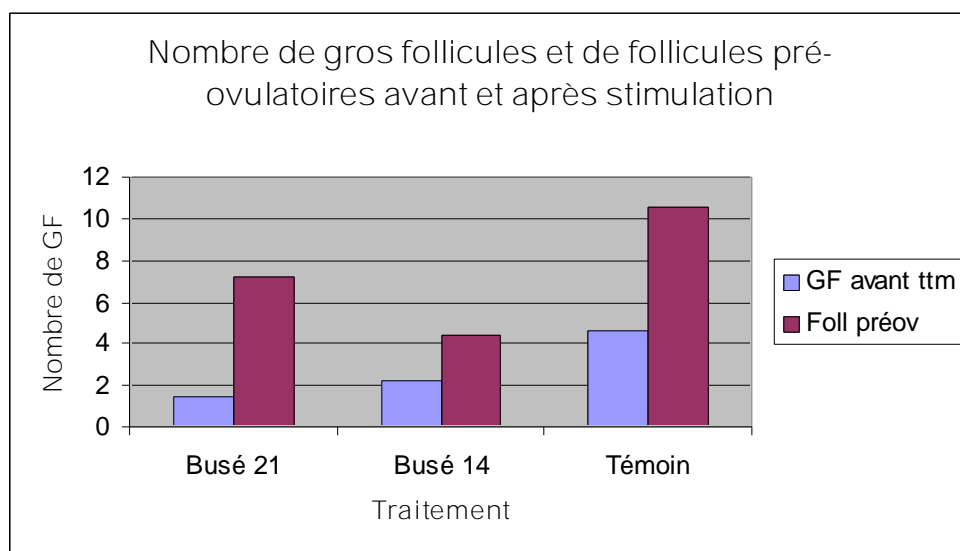
- *Au niveau ovarien*

La comparaison entre les nombres de gros follicules et de follicules pré-ovulatoires avant et après stimulation montre que l'effet de la FSH est très marqué sur la population folliculaire. Une nette augmentation du nombre de gros follicules est observée dans les trois groupes (tableau 22 , figure 24).

*Tableau 22 : Nombre moyen de gros follicules avant et après stimulation par les gonadotrophines*

	Busé 21	Busé 14	Témoin
GF avant ttm	1,4 ± 1,5	2,2 ± 4,6	4,6 ± 3,9
Foll préov	7,2 ± 2,2	4,4 ± 4,3	10,6 ± 4,2

*Figure 24: Nombre de gros follicules avant stimulation ovarienne et nombre de follicules pré-ovulatoires après stimulation.*

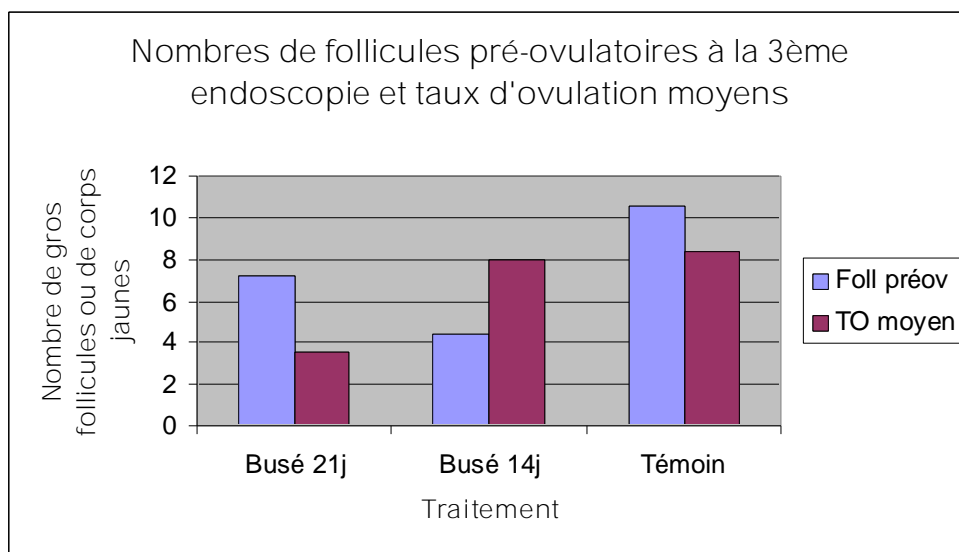


En ce qui concerne le taux d'ovulation, il semble qu'une grande partie des follicules se soient atrehiés et n'aient pas évolué vers l'ovulation dans le premier groupe. A l'opposé, des follicules qui n'étaient pas pré-ovulatoires à la troisième endoscopie ont continué leur maturation finale dans le groupe Buséréline 14 jours. Le meilleur taux d'ovulation est obtenu dans le groupe témoin (tableau 23 , figure 25).

*Tableau 23 : Nombres de follicules pré-ovulatoires et taux d'ovulation moyens*

	Busé 21j	Busé 14j	Témoin
Foll préov	7,2 ± 2,2	4,4 ± 4,3	10,6 ± 4,2
TO moyen	3,6 ± 2,5	8,0 ± 5,6	8,4 ± 5,6

*Figure 25 : Nombre moyen de follicules pré-ovulatoires et taux d'ovulation moyens*



#### 2.4. Conclusions partielles

Bien qu'après traitement à la Buséréline on observe une diminution significative du nombre de gros follicules, il semble en regardant les profils de FSH et de LH que le traitement ne fonctionne pas bien. Une des raisons pour expliquer ce phénomène pourrait être le fait que des pompes ayant déjà servi ont été réutilisées. Les fabricants des mini pompes déconseillent leur réutilisation mais les chercheurs de la station de Physiologie de la Reproduction à l'INRA de Nouzilly affirment pouvoir les réutiliser après nettoyage et désinfection. Une autre raison pouvant être avancée est une trop faible dose de Buséréline mais cet argument paraît surprenant en regard de la bibliographie (50µg/jour chez la brebis Lacaune). Par ailleurs, il ne semble pas que la durée d'administration de la Buséréline améliore le blocage hypophysaire.

Tout comme dans la première expérience, le protocole de stimulation ovarienne FSH-LH semble efficace, sauf dans le groupe Buséréline 21 jours pour lequel il semble que la LH ait mal fonctionné. La plupart des brebis utilisées ayant déjà servi dans la première expérience, certaines ont peut-être développé des anticorps anti gonadotrophines d'origine porcine.

Figure 26 : Planning schématisé de la troisième expérience

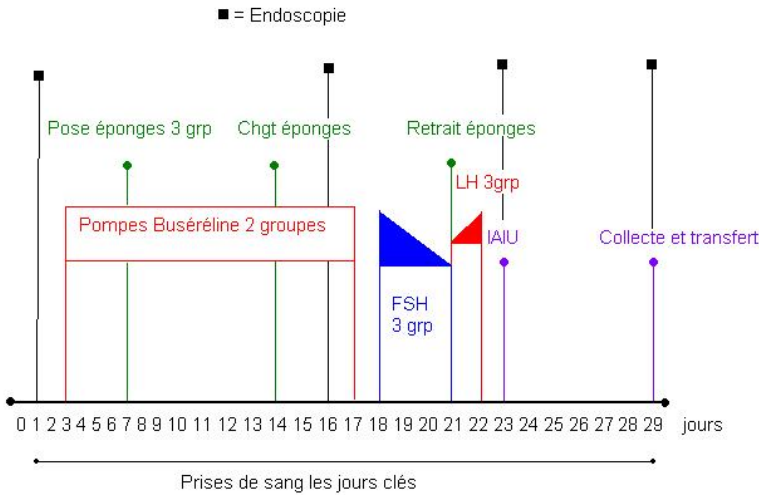
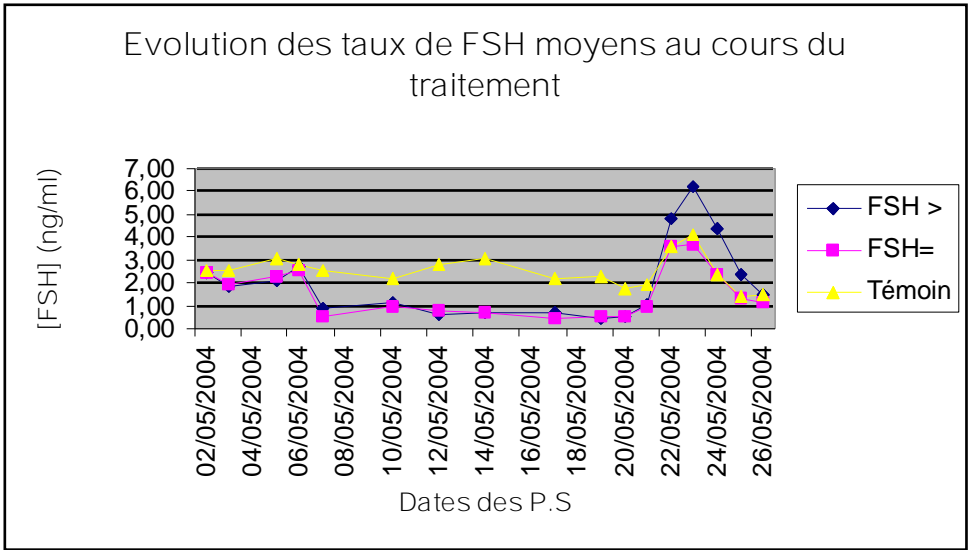


Figure 27 : Evolution des concentrations moyennes en FSH des différents groupes



### 3. Troisième expérience

#### 3.1. Rappels

Cette troisième expérience consiste à augmenter encore la dose de Buséréline (141µg/jour) qui est administrée aux brebis avec des pompes neuves. Pour compléter le traitement, les animaux reçoivent au moment de la pose une injection massive intramusculaire de 100 µg de Buséréline. En outre, un des deux groupes traités se verra augmenter les doses de FSH pour optimiser le recrutement des petits follicules.

Les 15 brebis utilisées dans cette expérience sont réparties en 3 groupes de 5. La figure 26 schématise cette expérience.

#### 3.2. Le blocage hypophysaire

- *Au niveau hormonal*

##### La FSH

Les graphiques 27 à 30 illustrent l'évolution des concentrations de FSH au cours du traitement. Les deux groupes ayant reçu de la Buséréline montrent une diminution significative ( $P < 0,05$ ) de la concentration en FSH dès le lendemain de la pose des pompes le 06/05/03. Un pic est observé le jour de la pose des pompes et le blocage survient le lendemain. Tous les animaux ayant reçu l'agoniste ont réagi au traitement. Les taux de FSH restent stables à un niveau de base jusqu'à administration de FSH exogène.

Dans le groupe témoin n'ayant pas reçu de Buséréline, les taux de FSH fluctuent et restent à des niveaux physiologiques. L'analyse statistique ( $P < 0,05$ ) montre une différence significative entre les taux de FSH des animaux traités et des animaux témoins à partir du 6<sup>ème</sup> jour de traitement jusqu'au lendemain du retrait des pompes.

##### La LH

Les graphiques 31 à 34 illustrent l'évolution des taux moyens et individuels de LH au cours de l'expérience.

Les taux de LH montrent eux aussi un léger pic le lendemain de la pose des pompes avant de diminuer progressivement. Cette diminution est significative et progressive montrant que l'effet du blocage sur les taux de base de la LH augmente lentement. Les taux atteints ne sont pas significativement plus faibles que ceux du groupe témoin.

Figure 28.: Evolution des taux individuels de FSH dans le groupe FSH à fortes doses

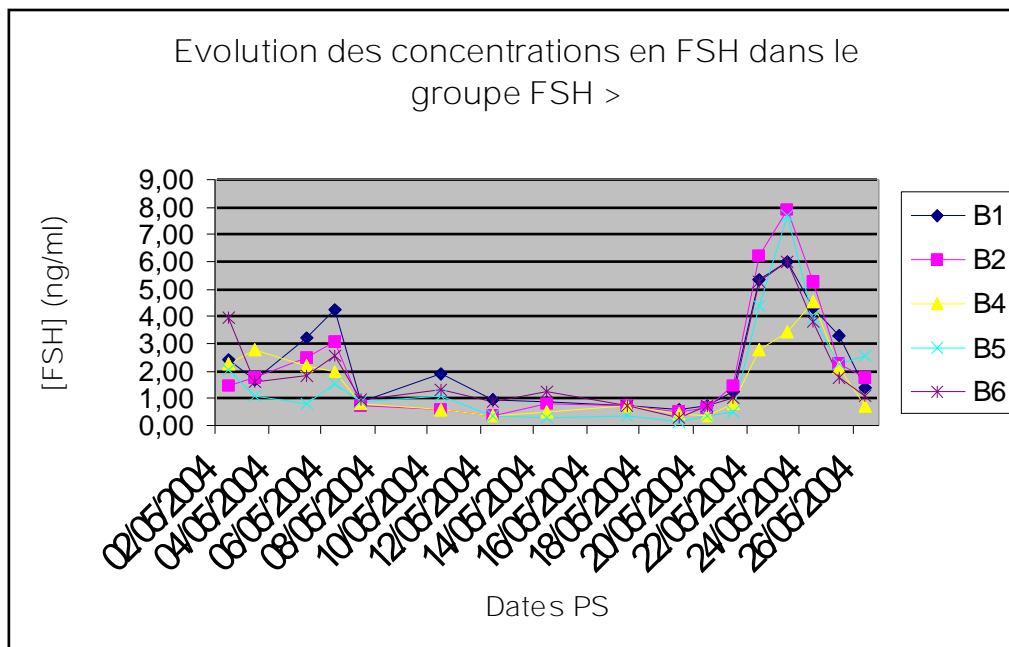
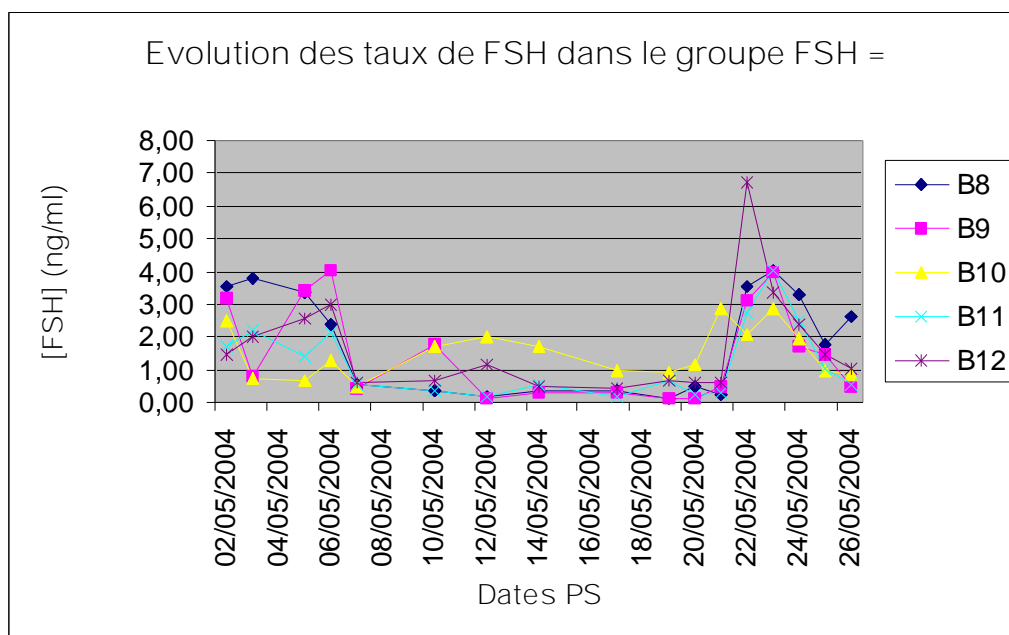
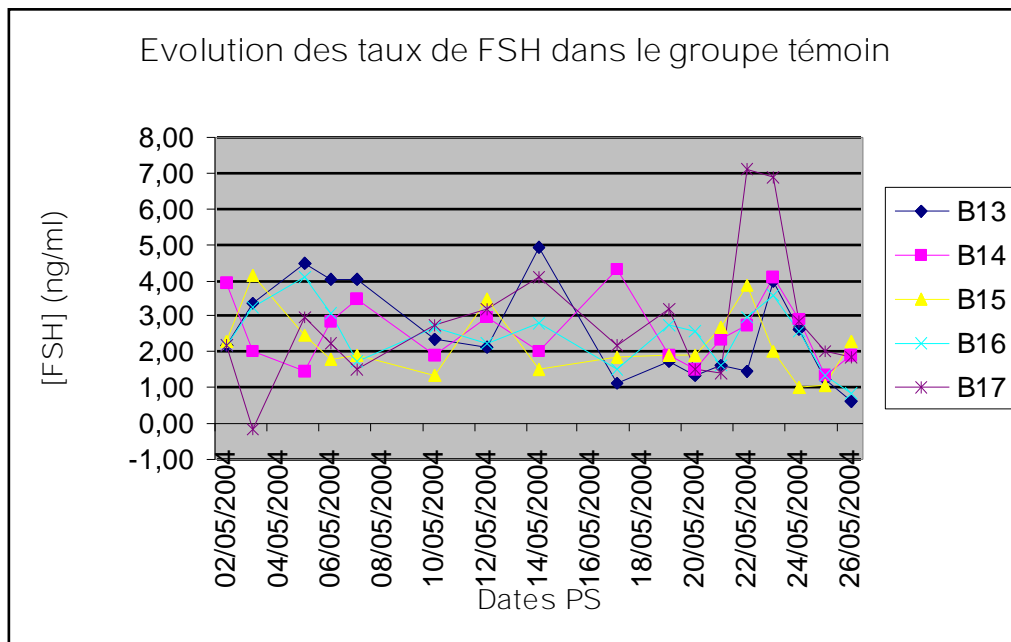


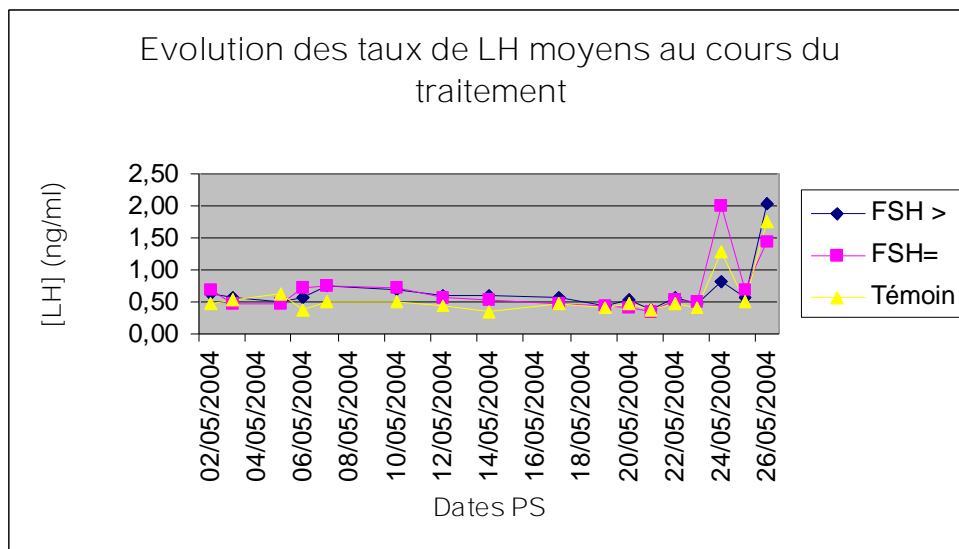
Figure 29: Evolution des taux individuels de FSH dans le groupe FSH à doses normales



*Figure 30 : Evolution des taux individuels de FSH dans le groupe témoin*

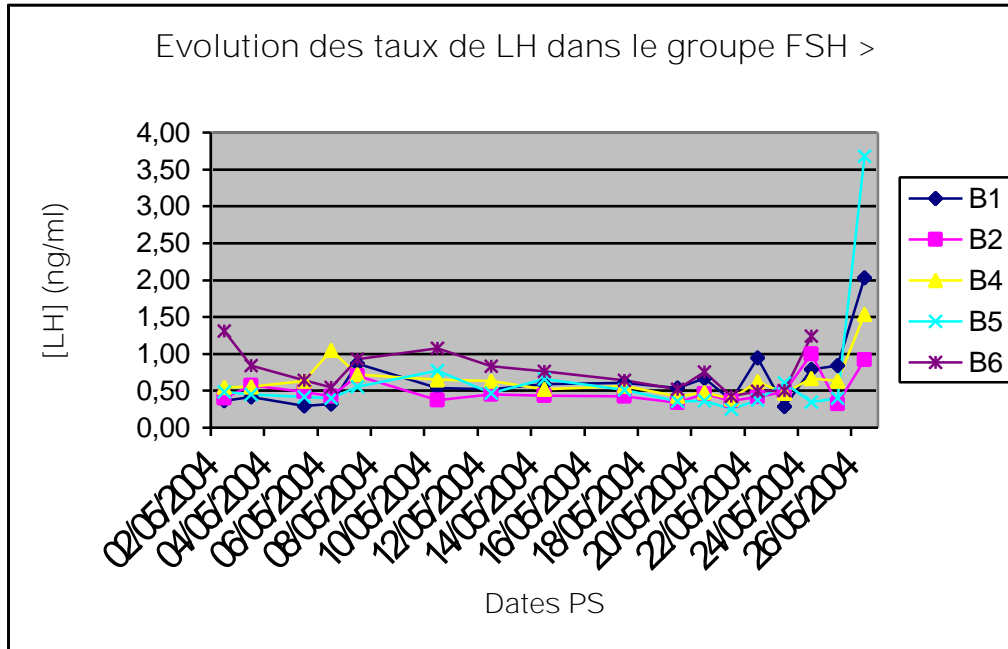


*Figure 31 : Evolution des taux moyens de LH au cours du traitement*

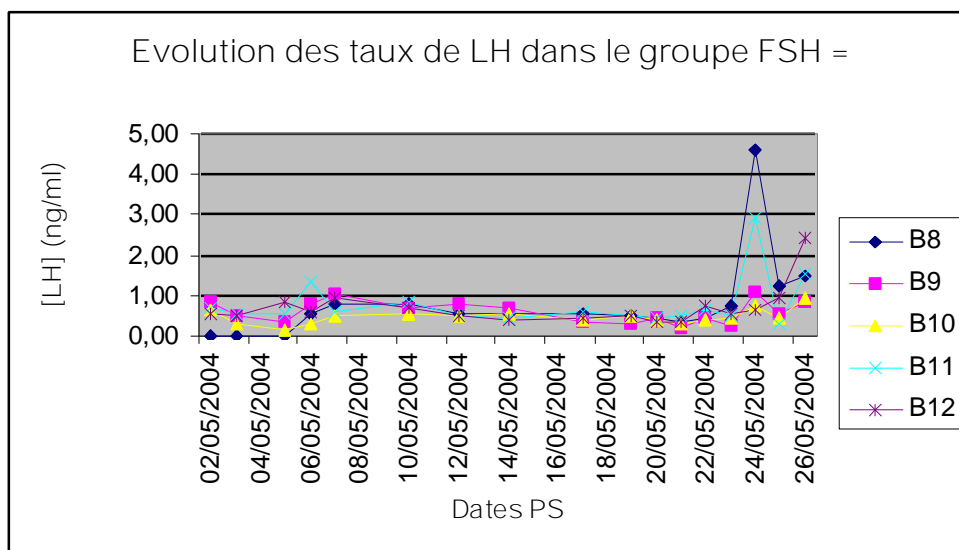




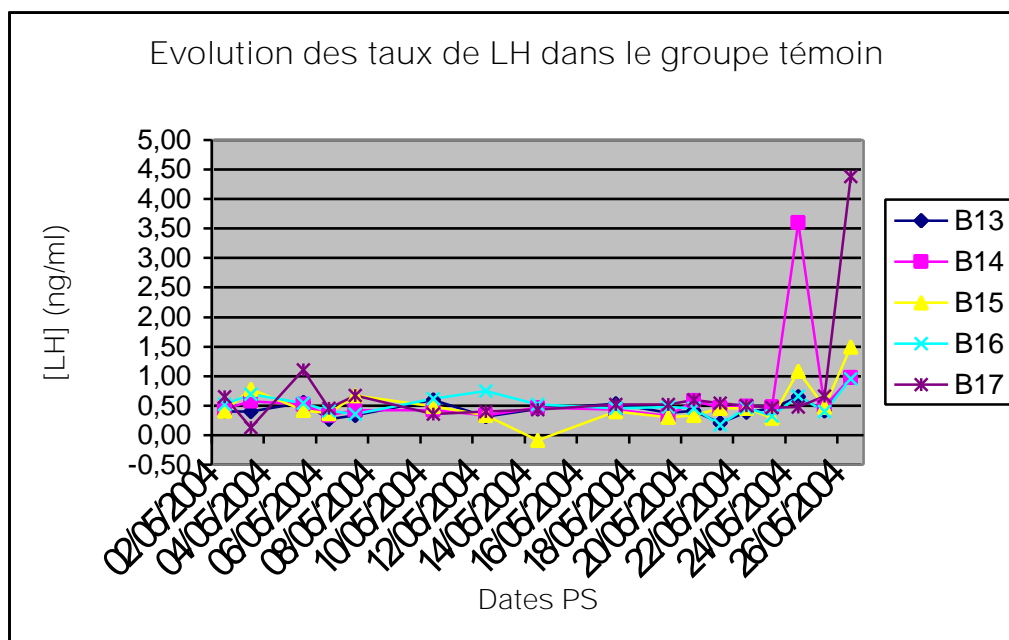
*Figure 32 : Evolution des taux individuels de LH dans le groupe FSH à fortes doses*



*Figure 33 : Evolution des taux individuels de LH dans le groupe FSH à doses normales*



*Figure 34 : Evolution des taux individuels de LH dans le groupe témoin*



- *Au niveau ovarien*

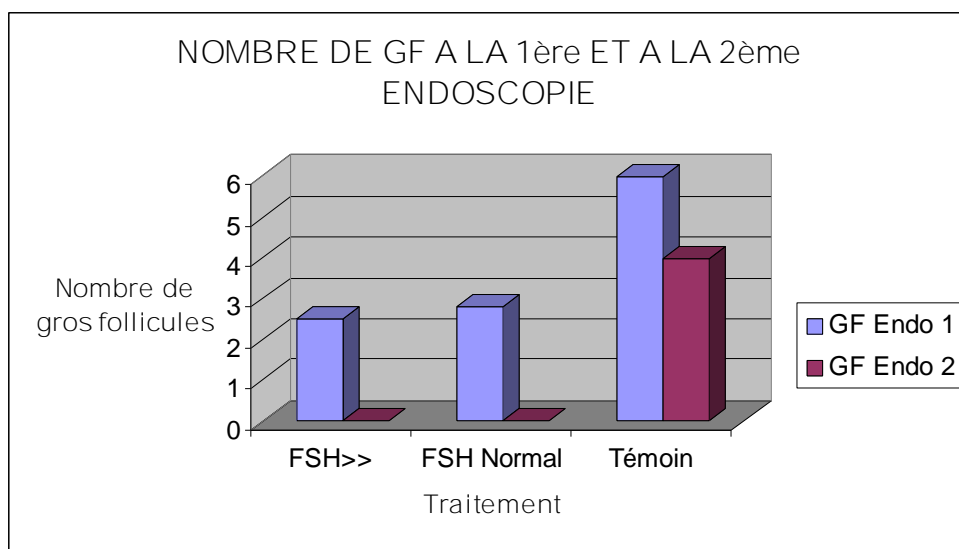
Le tableau 24 rapporte toutes les réponses ovariennes observées au cours des différentes endoscopies du traitement

Le tableau suivant donne les nombres de gros et de petits follicules présents sur les ovaires avant et après le traitement d'hypophysectomie chimique :

*Tableau 25: nombre de gros et de petits follicules avant et après blocage de l'hypophyse*

	FSH >>	FSH =	Témoin		FSH>>	FSH =	Témoin
GF Endo 1	2,5 ± 1,7	2,8 ± 1,6	6,0 ± 5,7	PF Endo 1	7,0 ± 4,2	10,6 ± 5,0	7,4 ± 9,1
GF Endo 2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	4,0 ± 2,4	PF Endo 2	18,8 ± 13,4	22,4 ± 7,8	13,0 ± 9,1

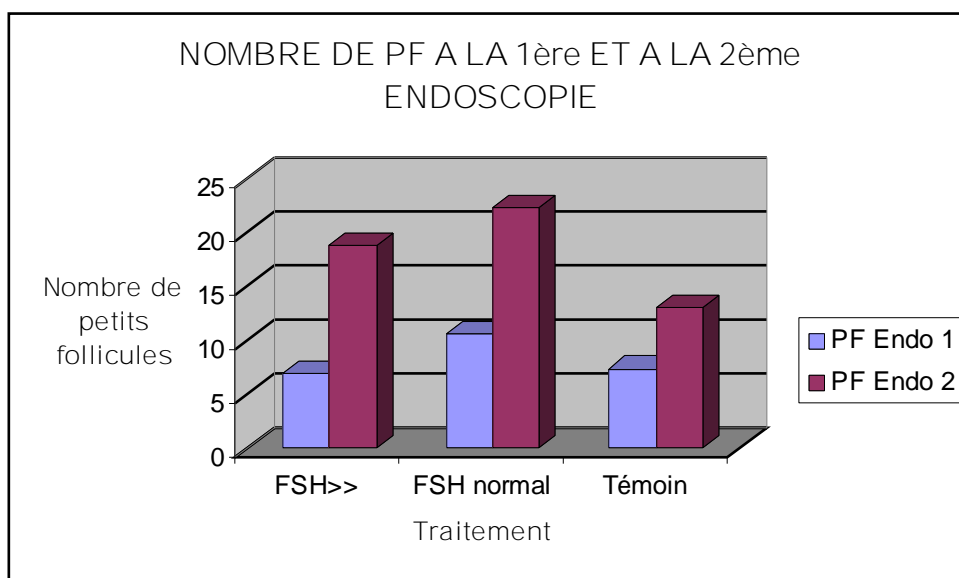
*Figure 35: nombre de gros follicules présents avant et après blocage de l'hypophyse*



*Tableau 24: Ensemble des réponses ovariennes observées lors des endoscopies réalisées tout au long de la troisième expérience*

Lot		Groupe FSH à fortes doses					Groupe FSH à doses normales					Groupe Témoin				
N°SANITEL		7261	7168	7264	7283	7263	3086	7298	7276	7232	7223	1814	3350	3346	3102	3124
N°expérience		1	2	4	5	6	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
E	CJ	2 CA						2 CA	5 CA	1 CA		1 CA	1 CA		7 CA	8 CA
N																
D	GF	4	1		4	1	1	5	4	2	2	16	4	2	3	5
O																
	P&MF	5	3	11	4	12	3	11	9	16	14	8	2	18	3	6
1	(<4mm)															
E	CJ	2 CA			1 CJ lutéal	1 CJ		5 CA	2 CA	5 CA	5 CA	2 CA			4 CA	2 CA
N				D: 1 CA												
D	GF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	6	8		3
O																
	P&MF	39	10	18	23	4	14	30	15	30	23	16	10	14	25	
2	(<4mm)															
E	CJ	2 CA			4 CA			3 CA				2 CA				
N								1 CJ								
D	GF	13	5	8	11	6	3	11	14	13	6	13	4	12	5	12
O																
	P&MF						G: 1								G: 20	
3	(<4mm)						D: 4									
E	CJ	10 CA	1 CA	3 CJ	2 CJ	2 CJ	6 CA		2 CA		6 CA	2 CA	1 CA	4 CA	7 CJ	2 CA
N					2 CA											3 CJ
D	GF		1		1	1		3	2					5		2
O	éventuels															
	P&MF	7			13	10		1	5		4	5	3	6		
4	(<4mm)															
									morte							

*Figure 36 : Nombre de petits follicules présents avant et après blocage de l'hypophyse*



Au départ de l'expérience, le nombre de gros follicules est proche dans les deux groupes destinés à recevoir le traitement bloquant et la moyenne est supérieure dans le lot témoin. Cette différence n'est seulement due qu'à une brebis présentant 16 GF et l'analyse statistique montre qu'elle n'est pas significative ( $P > 0.05$ ).

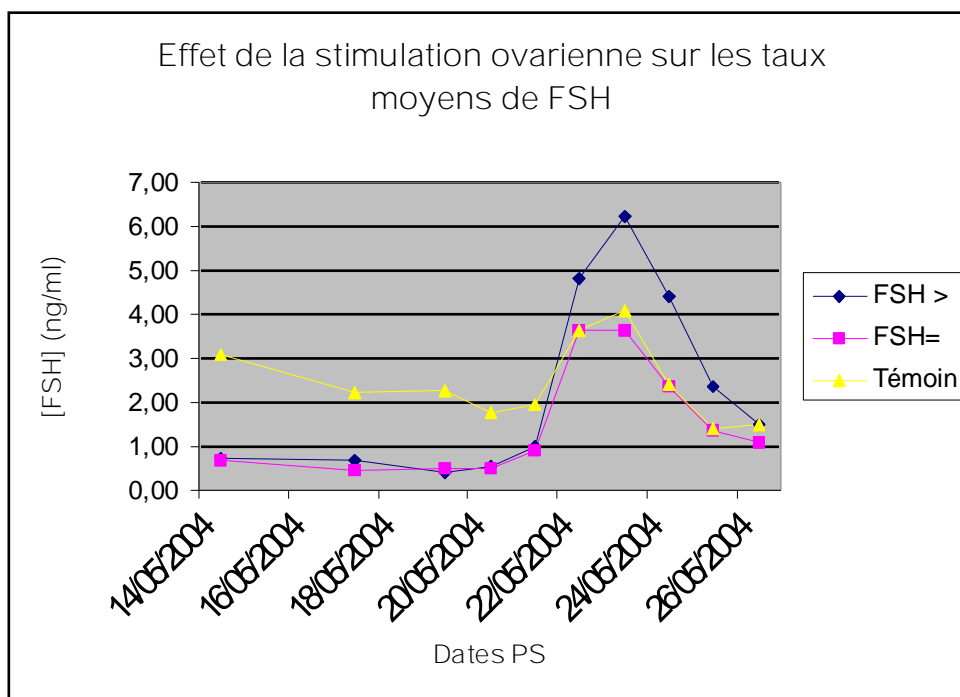
Le nombre de gros follicules après traitement à la Buséréline a été réduit à zéro alors qu'il reste élevé pour le lot témoin. Le nombre de petits follicules a plus que doublé. Le blocage de l'hypophyse a parfaitement fonctionné dans cette dernière expérience. Le nombre de gros follicules est nul, et un large pool de petits follicules est disponible pour la stimulation par les gonadotrophines exogènes, mais les importantes variations entre individus ne permettent pas à ces valeurs moyennes d'être significativement plus importantes.

### 3.3. La stimulation ovarienne

- *Au niveau hormonal*

#### La FSH

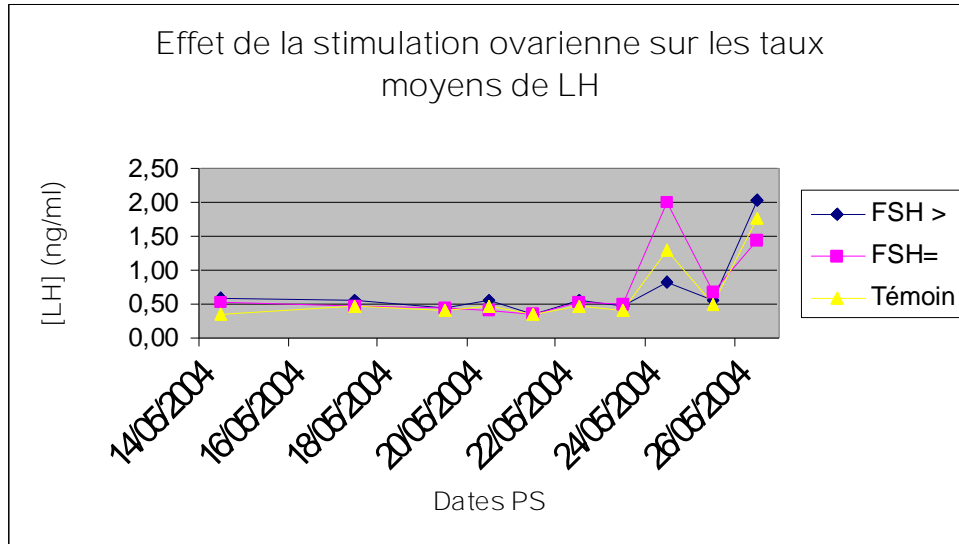
*Figure 37 : Taux moyens de FSH durant la stimulation par les gonadotrophines*



La FSH est injectée du 21/05 au 24/05 en doses décroissantes. Le groupe FSH à fortes doses a un pic de FSH plus important que les deux autres groupes. Ces observations nous montrent que la FSH administrée en intramusculaire s'est bien retrouvée dans le sang de l'animal

## La LH

Figure 38 : Taux moyens de LH durant la stimulation par les gonadotrophines



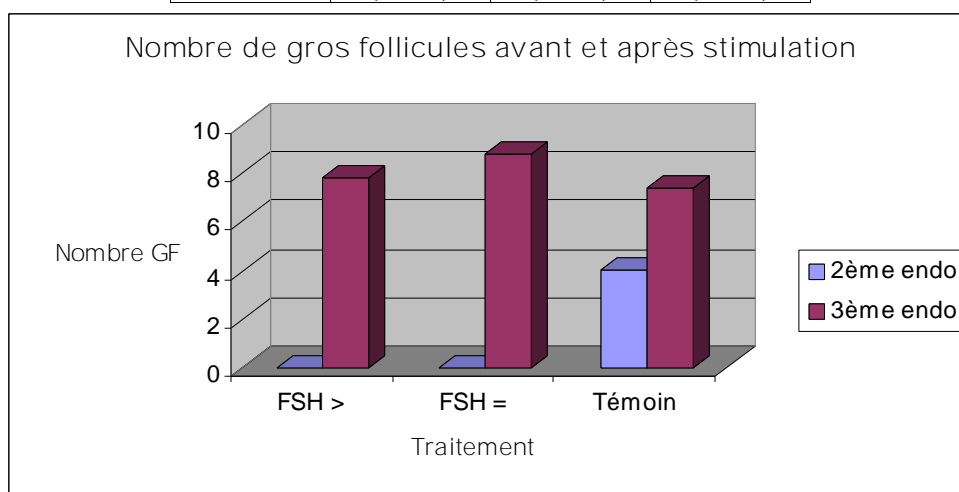
La LH est administrée les 24 et 25/05. On peut voir un premier pic le 25/05 et un second pic le 27/05, l'insémination ayant été réalisée le 26 mai.

- *Au niveau ovarien*

Les graphiques et tableaux suivants montrent le nombre de gros follicules avant et après stimulation.

Figure 39 : Nombre de gros follicules avant et après stimulation

	FSH >	FSH =	Témoin
2ème endo	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	4,0 ± 2,4
3ème endo	7,8 ± 3,4	8,8 ± 4,7	7,4 ± 4,3

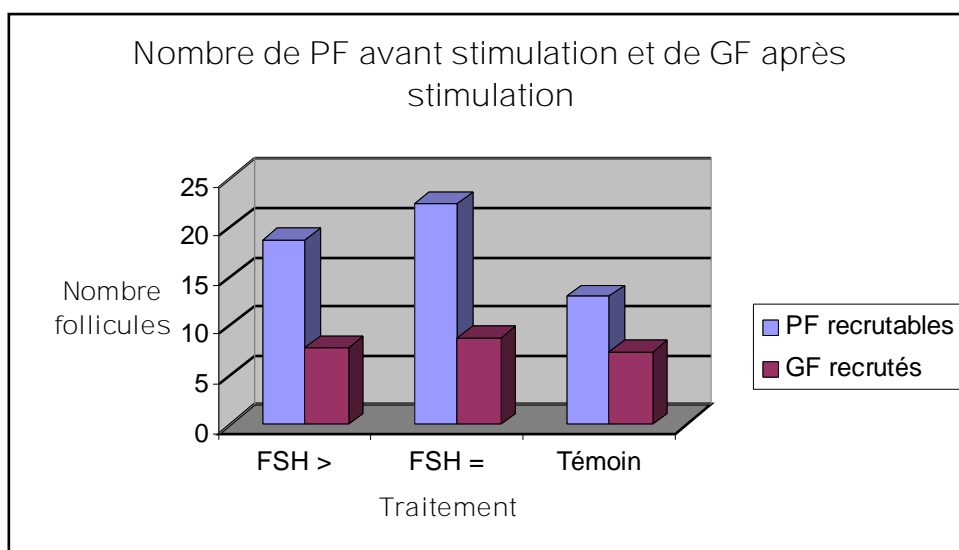


Le nombre moyen de gros follicules a augmenté dans les deux premiers groupes, mais il était nul après blocage. Si on le compare à celui des témoins, aucune différence significative n'apparaît.

Le nombre de follicules ovulatoires (GF) après stimulation par rapport au nombre de petits follicules recrutables avant celle-ci est relativement faible. Il est de l'ordre de 41 %, 39 % et 57 % respectivement pour les groupes « Buséréline + FSH élevé », « Buséréline + FSH normal » et « témoin ».

*Figure 40: Nombre de Petits follicules recrutables avant stimulation et nombre de gros follicules après stimulation*

	FSH >	FSH =	Témoin
PF recrutables	18,8 ± 13,4	22,4 ± 7,8	13,0 ± 9,1
GF recrutés	7,8 ± 3,4	8,8 ± 4,7	7,4 ± 4,3



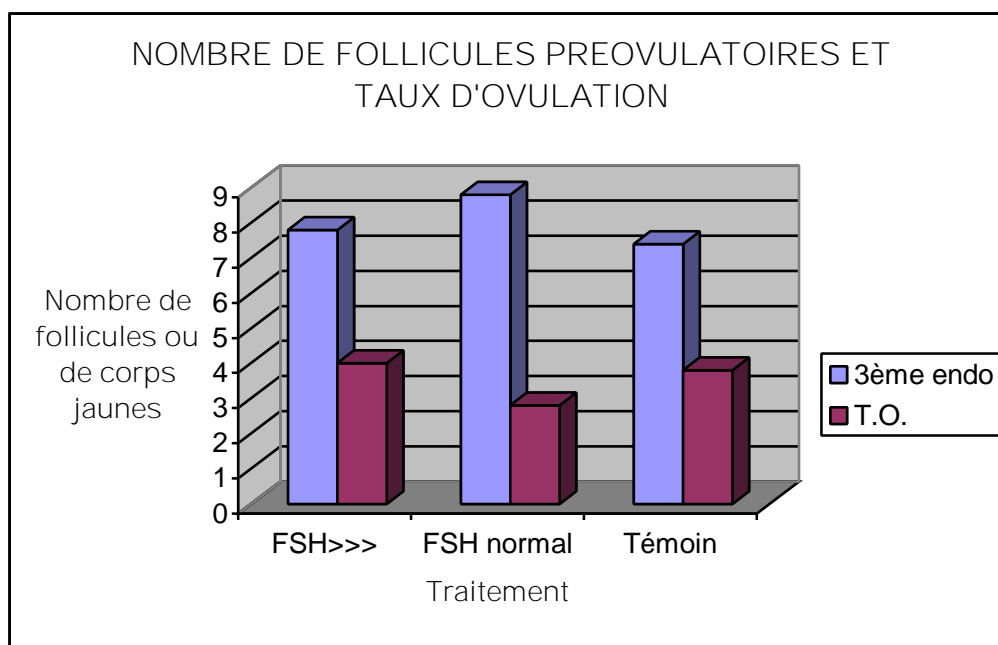
L'analyse statistique montre que ce rapport est significativement plus faible pour les animaux ayant reçu la Buséréline que pour le groupe témoin. En effet, dans le pool de petits follicules constitué grâce au blocage de l'hypophyse, peu ont été recrutés dans les deux premiers groupes. L'augmentation de la stimulation gonadotrope FSH n'a pas eu d'effet sur le recrutement et le développement des follicules disponibles.

Le taux d'ovulation, estimé d'après le nombre de corps jaunes et albicans ne diffère pas entre les lots mais est très faible (tableau). Par rapport au nombre de GF susceptibles d'ovuler, le pourcentage des GF ayant évolué jusqu'à l'ovulation est respectivement de 51, 32 et 51% selon les groupes. On pourrait supposer que la Buséréline a freiné cette capacité à maturer, mais que la dose élevée de FSH a contrecarré cet effet négatif.



Figure 41: Nombre de follicules préovulatoires et taux d'ovulation moyens

	FSH>>>	FSH normal	Témoin
3ème endo	7,8 ± 3,4	8,8 ± 4,7	7,4 ± 4,3
T.O.	4 ± 3,5	2,8 ± 3,0	3,8 ± 2,4



De plus, la plupart des corps jaunes présents à la dernière endoscopie sont des corpus albicans. Les corps jaunes subissent donc des régressions prématurées. Dans le groupe Busé + FSH normal, tous les corpus sont albicans alors que les 2/3 des CJ se sont lutéolisés prématurément chez les brebis Busé + FSH élevé et moins de la moitié chez les témoins. Peut-être peut-on voir ici aussi un effet favorable de la FSH sur la qualité des ovulations et des corps jaunes qui s'ensuivent. La raison de cette régression est une question qu'il faut résoudre par la suite des expérimentations. Plusieurs hypothèses, peut-être cumulatives peuvent être proposées. La qualité de la LH injectée ou son mode d'administration, la présence d'anticorps contre les gonadotrophines ou la contresaison.

#### 3.4. L'insémination, la collecte et le transfert des embryons

Après insémination, la collecte des embryons a été effectuée chez les brebis. Aucun embryon n'a été récolté et aucun transfert n'a donc pu avoir lieu.

#### 3.5. Conclusions partielles

Le blocage de l'hypophyse avec ces doses élevées de Buséréline administrée dans des mini pompes osmotiques neuves fonctionne à merveille, les brebis Texel semblent avoir besoin de 3 fois plus d'agoniste GnRH que les autres races reprises dans la littérature pour que leur hypophyse soit bloquée. A ces doses, les taux de FSH diminuent hautement significativement pour atteindre un niveau de base.

La stimulation ovarienne par les hormones gonadotropes n'a malheureusement pas bien fonctionné dans cette troisième expérience. Les taux d'ovulations sont médiocres, même dans le groupe témoin.

Vu les faibles taux d'ovulation, peu d'ovules ont du être fécondés. La collecte des embryons n'ayant pas un taux de réussite très élevé, ce faible nombre d'embryons potentiels réduit encore les chances d'en collecter. La méthode de récolte elle-même est encore à mettre au point.

## Discussion

## 1. L'état des ovaires avant traitement

*Tableau 26: Nombres moyens de gros follicules, petits follicules et corps jaunes (ou albicans) avant tout traitement lors des trois expériences*

	EXP 1	EXP 2	EXP 3
GF	2,6 ± 1,2	2,9 ± 2,1	3,6 ± 3,8
PF	9,9 ± 4,0	11,6 ± 6,6	8,3 ± 5,2
CJ+CA	0,8 ± 0,4	0,9 ± 1,2	1,8 ± 2,7

L'analyse statistique ne montre aucune différence significative ( $P < 0.05$ ) entre groupe et à l'intérieur des groupes pour ce qui est du nombre de gros follicules.

Pour ce qui est du nombre de petits follicules, aucune différence significative ( $P < 0.05$ ) n'est observée.

Au niveau des corps jaunes enfin, l'analyse statistique ne montre aucune différence significative.

Cette analyse est intéressante en ce sens qu'une évolution de la population folliculaire en fonction de la saison aurait pu exister. La première expérience se déroule en janvier, qui équivaut à la fin de la saison sexuelle. La deuxième expérience a été menée au mois de mars qui correspond au début de la contre-saison. Enfin, l'expérience du mois de mai s'est déroulée en période d'anoestrus profond.

Le tableau 27 comprend le nombre de gros follicules, petits follicules et corps jaunes présents sur les ovaires des animaux ayant participé aux trois expériences.

*Tableau 27: Population folliculaire avant traitement des brebis ayant participé aux trois expériences*

N° SANITEL	3124	7263	7223	3086	3102
GF exp1	3	4	1	4	1
GF exp2	2	7	2	0	5
GF exp3	5	1	2	1	3
PF exp1	4	10	15	10	6
PF exp2	6	12	11	4	16
PF exp3	6	12	14	3	3
GJ exp1	1	1	0	1	1
CJ exp2	0	1	1	0	4
CJ exp3	8	0	0	0	7

Pour ces animaux ayant subi les trois expériences consécutivement, une immunisation contre la FSH porcine (p-FSH) aurait pu être suspectée. La FSH porcine et la FSH ovine présentant beaucoup d'homologies, une immunisation contre la FSH porcine pourrait diminuer les taux endogènes de FSH. Une réduction du nombre de gros follicules ainsi qu'une augmentation des petits follicules avant traitement auraient pu être observées au fil des expériences. Aucune différence significative n'est observable à ce sujet. De plus, les

animaux ont reçu des traitements différents et il est dans ces conditions assez difficile de les comparer.

## 2. Le blocage hypophysaire

L'administration de Busérelina, agoniste synthétique de la GnRH, par spray nasal dans la première expérience à raison de 2 fois 100µg par jour ne paraît pas indiquée pour le blocage des sécrétions hypophysaires de gonadotrophines endogènes. En effet, l'administration de l'agoniste par cette voie utilisée avec succès chez la femme (900µg/j) parvient tout au plus à perturber les sécrétions de gonadotrophines. Aucune diminution significative des taux de FSH et de LH n'est observée, que ce soit en moyenne ou pour le profil individuel d'un animal à l'autre. Au niveau ovarien, la Busérelina ne montre aucun effet. Le nombre moyen de gros follicules après le traitement de blocage hypophysaire est augmenté, et le nombre de petits follicules recrutables reste inférieur dans le groupe traité à l'agoniste par rapport au groupe témoin (tableau 28).

*Tableau 28 : Nombre moyen de gros follicules et de petits follicules avant et après traitement à la Busérelina lors de la première expérience*

		Groupe Busé	Groupe Témoin
Avant traitement (Endo 1)	GF	2.8 ± 1.3	2.4 ± 1.1
	PF	8.8 ± 4.1	11.0 ± 3.9
Après traitement (Endo 2)	GF	5.6 ± 3.1	2.8 ± 1.9
	PF	12.0 ± 6.8	17.6 ± 2.7

L'administration continue de Busérelina par des mini pompes osmotiques à raison de 100µl par jour a provoqué une légère diminution des taux de FSH et de LH, mais bien qu'une légère augmentation du nombre de petits follicules ainsi qu'une légère diminution de petits follicules soient observées, ces résultats restent insuffisants pour un blocage hypophysaire (tableau 29).

*Tableau 29: Nombre moyen de gros follicules et de petits follicules avant et après traitement à la Busérelina lors de la deuxième expérience*

		Groupe Busé 21j	Groupe Busé 14j	Groupe Témoin
Avant traitement (Endo 1)	GF	2.4 ± 1.4	3 ± 2.8	3.2 ± 1.6
	PF	10.4 ± 7.9	8.4 ± 5.4	16.0 ± 4.7
Après traitement (Endo 2)	GF	1.4 ± 1.3	2.2 ± 4.6	4.6 ± 3.9
	PF	15.6 ± 7.6	12.4 ± 8.2	11.2 ± 3.0

De plus dans ce cas, la durée du traitement indiquée ne semble pas avoir d'effet. La durée de 14 jours de traitement recommandée par la littérature (*Cognié et Baril, 2002*) serait donc suffisante, seules les doses semblent à modifier.

Le blocage hypophysaire réalisé lors de la troisième expérience avec 141 µg de Busérelina par jour pendant 14 jours, administrés via des pompes osmotiques, ainsi qu'une injection de 100 µg de l'agoniste le jour de la pose des pompes a donné des résultats très flagrants sur les ovaires. Les profils moyens et individuels de FSH et de LH montrent une

diminution significative des taux plasmatiques de gonadotrophines après quelques jours de traitement (figures 27 à 34).

*Tableau 30: Nombre moyen de gros follicules et de petits follicules avant et après traitement à la Buséréline lors de la deuxième expérience*

		Groupe FSH >>	Groupe FSH Normal	Groupe Témoin
Avant traitement (Endo 1)	GF	2.5 ± 1.7	2.8 ± 1.6	6.0 ± 5.7
	PF	7.0 ± 4.2	10.6 ± 5.0	7.4 ± 9.1
Après traitement (Endo 2)	GF	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	4.0 ± 2.4
	PF	18.8 ± 13.4	22.4 ± 7.8	13.0 ± 9.1

Quand on sait que 50 µg par jour chez la brebis Welsh (*Mc Neilly et Fraser, 1987*) et 40 µg par jour chez la brebis Lacaune (*Cognié et Baril, 2002*) suffisent pour inhiber les sécrétions endogènes de FSH et de LH, les doses administrées dans cette expérience sur la brebis Texel paraissent énormes et des doses aussi importantes ont peut-être un effet sur les ovaires car la stimulation qui suit ce blocage fonctionne très mal.

Il découle de ce travail qu'un blocage hypophysaire correct nécessite chez la brebis Texel des doses importantes de l'agoniste GnRH Buséréline. En effet, si 40 µg de Buséréline administrés quotidiennement pendant 14 jours suffisent à bloquer d'autres races de brebis (brebis Lacaune) comme prouvé dans la littérature, il semble que la race Texel, race la plus répandue dans notre pays, a besoin de trois fois plus de Buséréline pour voir ses taux de FSH et de LH tomber à un niveau de base, permettant à un large pool de petits follicules recrutables de se former.

Les effets de l'agoniste sont hautement significatifs sur les taux de FSH, mais pas sur les taux de LH. Cette observation peut s'expliquer par le fait que pour estimer valablement la sécrétion de LH, il ne faut pas seulement se baser sur un taux de base mais mesurer la fréquence et l'amplitude des pulses de sécrétion

### 3. La stimulation ovarienne

L'efficacité de la stimulation ovarienne est à peu près identique dans les deux premières expériences, mais elle est nettement plus faible dans la troisième expérience. En effet, le rapport du nombre de petits follicules recrutables et du nombre de follicules effectivement recrutés est très faible, et ce rapport est significativement plus faible dans le groupe ayant reçu la Buséréline. Encore une fois, on peut se poser la question de la qualité de la FSH administrée mais aussi d'un éventuel effet des doses importantes de la Buséréline sur l'ovaire (tableau 31).

*Tableau 31: Pourcentages moyens de follicules recrutés par administration de pFSH selon les doses de Busérelina administrées*

	Spray 100µg	Pompe 100µg 21 j	Pompe 100µg 14j	Pompe 141µg FSH>>	Pompe 141µg FSH=
Taux de recrutement	8.4/12 = 70%	7.2/15.6 = 46%	4.4/12.4 = 35%	7.8/18.8 = 41%	8.8/22.4 = 39%

La présence d'anticorps anti p-FSH ainsi que la contre-saison peuvent aussi expliquer ce problème au niveau du recrutement. Notons que les brebis 3086 et 3102, qui ont toutes deux participé aux trois expériences ainsi qu'à une expérience de superovulation effectuée en novembre 2003 présentent une diminution significative du recrutement folliculaire. Ces observations ainsi qu'un taux de recrutement (nombre de follicules recrutés par la stimulation/nombre de petits follicules recrutables avant stimulation . 100) moyen plus faible dans le groupe témoin de la troisième expérience que dans les groupes témoin des deux premières laissent penser qu'une immunisation contre la p-FSH pourrait expliquer la mauvaise efficacité de celle-ci, particulièrement dans la troisième expérience (tableau 32).

*Tableau 32: Pourcentages de follicules recrutés par l'administration de pFSH exogène dans les groupes témoin des trois expériences*

	Expérience 1	Expérience 2	Expérience 3
Taux de recrutement	12.6/17.6 = 72%	10.6/11.2 = 95%	7.4/13 = 57%

La moyenne du taux de recrutement des groupes témoin est de 75% de recrutement. Le groupe ayant reçu la Busérelina par spray nasal dans la première expérience a un taux de recrutement moyen de 70%. Sachant que la Busérelina dans ce groupe n'a eu aucun effet sur les taux de gonadotrophines et sur l'ovaire, ce groupe peut s'apparenter à un groupe témoin n'ayant pas reçu de Busérelina. Ces observations faites et en regardant les taux de recrutement des groupes pour lesquels des doses importantes de Busérelina ont été administrées par des pompes osmotiques (35-46%), il semble pertinent de penser que la Busérelina a bien un effet sur l'ovaire et le recrutement des petits follicules.

Au niveau absolu, les taux d'ovulation moyens de 9,6 dans le groupe témoin de la première expérience et respectivement de 8,0 et 8,4 pour le groupe Busérelina 14 jours et pour le groupe témoin de la deuxième expérience sont satisfaisants par rapport à la littérature pour une stimulation FSH-LH. En effet, le taux d'ovulation suite à une stimulation FSH-LH varie entre 9 et 13 (*Cognié et Baril, 2002*). Par contre les taux d'ovulation des trois groupes de la dernière expérience sont anormalement bas. Malgré les éponges de progestagène, ceci pourrait s'expliquer par les variations saisonnières, les femelles de la dernière expérience étant en période d'anoestrus profond. La qualité de la LH pourrait aussi être une cause de ces faibles taux d'ovulation, mais la LH administrée est la même dans les différents lots et dans les trois expériences. La littérature rapporte des baisses des taux d'ovulation en cas d'immunisation contre les gonadotrophines. Le tableau 33 montre les taux d'ovulations moyens des animaux ayant participé aux trois expériences.

*Tableau 33: Taux d'ovulation moyens des brebis ayant participé aux trois expériences*

N° SANITEL	3124	7263	7223	3086	3102
T.O. exp1	2	8	6	10	9
T.O. exp2	3	4	5	6	7
T.O. exp3	3	7	6	6	7

L'analyse statistique ne montre aucune tendance à la baisse significative.

L'effet de la Buséréline sur l'ovaire et le peu de follicules recrutés peuvent aussi expliquer ces faibles taux d'ovulation dans la troisième expérience. Le tableau 34 contient les pourcentages de follicules susceptibles d'ovuler qui ont réellement ovulé.

*Tableau 34: Pourcentages de follicules susceptibles d'ovuler (6-7mm) ayant réellement ovulé après administration de pLH dans différents groupes*

	Témoin 1	Témoin 2	Témoin 3	Busé21j	Busé FSH>	Busé spray
% ovulations	76%	79%	51%	50%	51%	30%

Bien que ce pourcentage soit important dans les groupes témoins des deux premières expériences, celui-ci est de 30% pour le groupe Buséréline de la première expérience, groupe pouvant être considéré au même titre que les groupes témoins au vu de l'absence d'effet de la Buséréline. Ces données nous ramènent au problème principal de la variabilité de la réponse au traitement de superovulation et il est possible que cette variabilité entre donneuses reflète des différences génétiques dans l'aptitude à la superovulation (*Cognié et al, 2000*)

#### 4. La régression lutéale prématurée

La littérature indique un effet de la contre-saison sur la régression des corps jaunes. En effet, des femelles en période d'anoestrus présenteraient des cycles incomplets avec régression lutéale prématurée. De plus, on peut suspecter un effet de la Buséréline sur l'ovaire et la stéroïdogenèse surtout avec des fortes doses. Or, la régression prématurée est surtout observée dans la troisième expérience, se déroulant en période d'anoestrus profond et dans laquelle les doses les plus importantes de Buséréline sont administrées. Le tableau 35 montre le pourcentage de corps jaunes ayant régressé après ovulation.

*Tableau 35: Proportion de corps jaunes ayant régressé en corpus albicans observés lors de la dernière endoscopie dans les trois expériences*

Expérience 1		Expérience 2			Expérience 3		
Témoin	Busé	Témoin	Busé21	Busé14	Témoin	FSH>	FSH=
15 %	0 %	12 %	17 %	9 %	47 %	65 %	100 %

Lors de la première expérience, toutes les régressions ont eu lieu chez le même animal, sans quoi la proportion de corps jaunes régressés serait de 0 %. Ces résultats ne montrent pas un effet significatif de la Buséréline sur la régression lutéale. Par contre, l'expérience 2 montre des taux de régression plus importante que la première, et ces taux atteignent leur



maximum dans la troisième expérience, les animaux sont alors en période d'anoestrus profond. L'hypothèse de la contre-saison pour expliquer la régression prématurée des corps jaunes semble acceptable.

#### 5. La collecte et le transfert des embryons

Le transfert chirurgical pratiqué sur quelques animaux de la première expérience ne s'est pas avéré efficace. De plus, l'opération conduit à la formation d'adhérences sur le système reproducteur qui gênent considérablement la pratique des expériences ultérieures.

La sonde à 2 voies a été testée pour la récolte des embryons mais n'a pas prouvé son efficacité. Le retour du milieu de récolte était insuffisant et les pertes dans l'utérus ou l'abdomen trop importantes.

Une autre technique pratiquée lors des expériences est d'injecter le milieu de collecte à une extrémité de la corne et de l'aspirer à l'autre extrémité en prenant soin de bloquer les deux extrémités avec les doigts pour éviter la descente ou la remontée du liquide et des embryons. Ce système, difficile à appliquer se montre encore une fois inadapté pratiquement, et les fuites sont trop nombreuses.

La technique de récolte des embryons doit donc être optimisée. En effet, l'étanchéité des différents systèmes testés est mauvaise et les chances de perdre des embryons dans l'abdomen de l'animal lors des manipulations sont grandes. Un système plus étanche est à mettre au point pour augmenter les taux de récolte.

Le transfert proprement dit est par contre au point puisque les trois embryons transférés au cours de ce travail sont arrivés à terme.

## Conclusions et perspectives

## Conclusion

Dans le but d'optimiser les techniques de superovulation chez la brebis Texel, race de moutons la plus répandue dans notre pays, trois expériences ont été réalisées dans le cadre de ce travail. La première expérience s'est déroulée au mois de janvier qui correspond à la fin de la saison de reproduction, la deuxième s'est déroulée au mois de mars, en début d'anoestrus, et la troisième a eu lieu au mois de mai, période de l'année durant laquelle toutes les brebis sont en anoestrus profond.

Ces travaux ont consisté à comparer différents modes et taux d'administration d'un agoniste de la GnRH, la Busérelina et d'observer les résultats sur la population folliculaire à différents moments de l'expérience, les taux plasmatiques de FSH et de LH, et le taux d'ovulation.

Il a été retiré de ces expériences que la brebis Texel a besoin d'une dose d'au moins 100 µg de Busérelina administrée par des mini pompes osmotiques durant 14 jours pour observer un effet drastique sur les sécrétions de FSH et de LH et un blocage de la croissance folliculaire terminale. Les ovaires ne possèdent alors plus aucun gros follicules mais un nombre important de petits follicules recrutables. Cependant, l'administration de gonadotrophines exogènes n'a pas permis dans ce cas d'obtenir un taux d'ovulation supérieur par rapport à d'autres traitements.

Les raisons de ce manque d'efficacité peuvent être la répétition des traitements qui peut engendrer la formation d'anticorps contre les gonadotrophines d'origine porcine, un effet inhibiteur de la Busérelina sur la réponse folliculaire aux hormones gonadotropes ou encore une mauvaise qualité des gonadotrophines exogènes injectées aux animaux. De plus, la contre-saison pourrait être la cause de régressions lutéales prématurées apparues surtout lors de la troisième expérience.

## Perspectives

Le blocage hypophysaire ayant donné de bons résultats avec 140 µg de Busérelina par jour via des pompes osmotiques ainsi qu'une injection de 100 µg le jour de la pose des pompes, ce protocole peut-être poursuivi mais il serait intéressant de comprendre les effets directs de la Busérelina sur les ovaires. Des expériences sur ovaires in vitro pourraient nous éclairer à ce sujet. D'autres produits pour bloquer l'hypophyse pourraient-être essayés. La Desloréline par exemple qui est commercialisée sous forme d'implants et est actuellement disponible pour les bovins et les humains pourrait être essayée sur les ovins.

En ce qui concerne la stimulation, la dose normale semble efficace bien qu'une immunisation contre les gonadotrophines pourrait exister. De plus, les produits FSH-LH purifiés actuellement offerts par le Laboratoire de Physiologie de la Reproduction de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'ULg seront chers lors du passage de la recherche à l'application commerciale de celle-ci. De la FSH ovine, actuellement commercialisée pourrait être utilisée, empêchant en même temps l'immunisation. Des essais pourraient aussi être réalisés pour tester l'efficacité de l'hCG à la place de la LH. Enfin, de la FSH moins purifiée existant sur le marché devrait pouvoir fonctionner.

Des essais pour trouver la cause de la régression lutéale devraient être réalisés. Des expériences sur ovaires in vitro pour étudier l'effet de la Buséréline sur l'activité folliculaire et lutéale et la stéroïdogenèse pourraient nous éclairer à ce sujet. La mesure des taux d'anticorps serait aussi intéressante dans des expériences futures.

En cas d'insémination, l'administration de P4 pendant les 6 jours entre l'insémination artificielle et la collecte serait un traitement de substitution à cette régression prématurée du corps jaune, ce dernier étant nécessaire au maintien des embryons.

Enfin, la technique de collecte doit être améliorée. La collecte par endoscopie semble la moins traumatisante pour l'animal et un système récent semble avoir fait ses preuves : la collecte par endoscopie à l'aide d'une fine sonde à ballonnet introduite dans l'utérus.

Références bibliographiques
-----------------------------

Armstrong, D.T., Evans, G. Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. *Theriogenology* 19 n°1, 31-42 (1983).

Bari, F., Khalid, M., Wolf, B., Haresign, W., Murray A., Merrell B. The repeatability of superovulatory response and embryo recovery in sheep. *Theriogenology* 56 n°1, 197-198 (2001).

Baril, G., Brebion, P., Chesné, P. Manuel de formation pratique pour la transplantation embryonnaire chez la brebis et la chèvre. *Etude FAO production et santé animales* (1993).

Barrier-Battut, I., Le Poutre, N., Trocherie, E., Hechet, S., Grandchamp des Raux, A., Nicaise, J.L., Vérin, X., Bertrand, J., Fiéni, F., Hoier, R., Renault, A., Egrou, L., Tainturier, D.,

Bruyas, J.F. Use of buserelin to induce ovulation in the cyclic mare. *Theriogenology* 55 n°8, 1679-1695 (2001).

Bister, J.L., Artoisenet, P., Paquay, R. Traitements hormonaux et fécondité de la brebis Texel en période normale de lutte. *Revue de l'agriculture* 36, 1451-1458 (1983).

Bister, J.L. La reproduction assistée chez l'homme et les mammifères domestiques. *Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, Namur* (2003).

Bister, J.L. La reproduction des petits ruminants. *Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, Namur* (2002).

Bister, J.L. Reproduction assistée chez les mammifères. *Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, Namur* (2001).

Bister, J.L., Archa, B., Lovato, A.L., Wergifosse, F., Depiereux, E., Paquay, R. Effect of Buserelin or Antarelix on FSH and LH plasma levels in superovulated sheep (2003).

Bister, J.L., Derycke, G., Jacques, E., Paquay, R. Effects of immunisation against androstenedione on the ovarian follicular dynamics and ovulation rate in ewes. *Fund. Clin. Pharmacol.* 1 (1988).

Bister, J.L., Derycke, G., Meersschaert, A., Paquay, R. Reports about intra-uterine insemination with laparoscopy in Texel and Suffolk sheep. *Quadras Jornadas Internacionales de Reproduccion Animal e Insemination Artificial*, Leon (Espana) (1989).

Bister, J.L., Jacques, E., Titeca, E., Trinteler, M.F., Paquay, R. Reproductive physiological modifications induced by immunisation against androstenedione in texel axes. *3rd World congress on sheep and beef cattle breeding*, 650-660 (1988).

Bister, J.L., Perrard, B., Lagache, F., Paquay, R. Exogenous GH administrations stimulate the ovarian activity in ewes during the anestrus. *Journal of reproduction and fertility* 14, 18-19 (1994).

Brebion, P., Baril, G., Cognié, Y., Vallet, J.C. Transfert d'embryons chez les ovins et les caprins. *Ann zootech* 41 : 331-339 (1992).

Brebion, P., Cognié, Y. Increased superovulation in the ewe following 14 days of GnRH agonist pre-treatment. *Proc 5th Mtg. Ass. Eur. Trans. Emb.* (AETE) 106 abstr.(1989).

Bretzlaff, K.N. and Madrid, N. Clinical use of Norgestomet ear implants or intravaginal pessaries for synchronisation of estrus in anoestrous dairy goats. *Theriogenology* 31, 419-423 (1989).

Brown, R.E. An introduction to neuroendocrinology, p.37 (1994).

Cognié, Y. Nouvelles méthodes utilisées pour améliorer les performances de reproduction chez les ovins. *Production animale* (1988).

Cognie, Y. State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology* 51, 105-116 (1999).

Cognie, Y., Baril, G. Le point sur la production et le transfert d'embryons obtenus in vivo et in vitro chez la brebis et la chèvre. *INRA Prod. Anim.* 15, 199-207 (2002).

Cognié, Y., Baril, G., Poulin, N., Beckers, J.F. The ovulation rate obtained after a superovulatory treatment associating GnRH antagonist and pFSH is highly repeatable. *16th Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association, Santander*, 130 (abstr.) (2000).

Cole, H.H. Studies on reproduction with emphasis on gonadotropins, antigonadotropins and progadotropins. *Biology of reproduction* 12, 194-211 (1975).

Colleau, J.-J., Heyman, Y., Renard, J.-P. Les biotechnologies de la reproduction chez les bovins et leurs applications réelles ou potentielles en sélection. *INRA Prod. Anim.* 11, 41-56 (1998).

Crowe, M.A., Padmanabhan, V., Hynes, N., Sunderland, S.J., Enright, W.J., Beitins, I.Z., Roche, J.F. Validation of a sensitive radioimmunoassay to measure serum follicle stimulating hormone in cattle: correlation with biological activity. *Animal reproduction science* 48 n°2-4, 123-136 (1997).

Derycke, G., Bister, J.L., Jacques, E., Paquay, R. Effects of immunisation against androstenedione on hormonal levels in ewe. *Fund. Clin. Pharmacol.* 1 (1988).

Driancourt, M.A., Gougeon, A., Royere, D., Thibault, C. La fonction ovarienne. La reproduction chez les mammifères et l'homme de THIBAUT C., LEVASSEUR M.C., *Editions Ellipse*, Paris (1991).

Dufour, J.J., Cognié, Y., Marmillod, P., Mariana, J.C., Romain, R.F. Effects oh the Booroola Fec gene on ovarian follicular populations in superovulated Romanov ewes pretreated with a GnRH antagonist. *Journ. Reprod. Fert.* 118 n°1, 85-94 (2000).

Folch, J., Ramon, J.P., Cocero, M.J., Alabart, J.L., Beckers, J.F. Exogenous growth hormone improves the number of transferable embryos in superovulated ewes. *Theriogenology* 55, 1777-1785 (2001).

Fortune, J.E. Ovarian follicular growth and developpement in mammals. *Biology Reprod.* (1994).

Fry, R.C., Clarke, I.J. & Cahill L.P. Changes in gonadotrophin concentrations are not necessarily involved in ovarian compensation after unilateral ovariectomy in sheep. *J. Reprod. Fert.* 79 (1987).

Goldsteinn, D.P. Gestational neoplasms, *Endocrinology* 3, 1629-1648 (1979).

Gong, J.G., Wilmut, I., Bramley, T.A., Webb, R. Pre treatment with recombinant somatotropin enhances the superovulatory response to FSH in heifers. *Theriogenology* 43, 221, (abstr.) (1995).

Gonzalez-Bulnes, A., Garcia-Garcia, R.M., Souza, C.J.H., Santiago-Moreno, J., Lopez-Sebastian, A., Cocero, M.J. and Baird, D.T. Patterns of follicular growth in superovulated sheep and influence on endocrine and ovarian response. *Reprod. Dom. Anim.* 37, 357-361 (2002).

Gordon, I. Reproduction in sheep and goats, Controlled reproduction in farm animals series, 2, Cab international, ISBN: 0-85199-1157 (1997).

Gougeon, A., Lefèvre, B., Testart, J. Recrutement et sélection du follicule dominant pendant le cycle menstruel spontané ou stimulé chez la femme. *Période péri-ovulatoire* (Salat-Baroux J. et Thibaut Ch.), *Masson Paris*, ISBN : 2-225-80221-1, 1-11 (1984).

Hedon, B., Neveu, S., Bringer, J., Arnal, F., Chinchole, J.M., Humeau, C., Cristol, P., Diafouka, F., Gibert, F., Mares, P., Laffargue, F., Viala, J.L. L'inhibition de la LH au cours de la stimulation de l'ovulation pour fécondation in vitro. *Horm. Reprod. Metab.* 3, 175-178 (1986).

Herin, M. Cours d'embryologie, biologie du développement. *Facultés Universitaires Notre Dame de la Paix*, Namur (2001).

Hodgen, G.D., Schenken, R.S., Goodman, A.L., Kenigsberg, D., Littman, B.A. Periovulatory events in the primate ovarian menstrual cycle. *Période péri-ovulatoire*, *Masson Paris*, ISBN: 2-225-80221-1, 13-19 (1984).

Holland, F.J., Fishman, L., Costigan, D.C., Luna, L., Leeder, S. Pharmacokinetic characteristics of the gonadotropin-releasing hormone analog D-Ser (TBU)-6EA-10 luteinising hormone-releasing hormone (Buserelin) after subcutaneous and intra-nasal administration in children with central precocious puberty. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 63, 1065-1070 (1986).

Leclercq, L. Première approche de la maturation et de la fécondation in vitro de l'ovocyte ovin (1994).

- Lymberopoulos, A.G., Amiridis, G.S., Kühholzer, B., Besenfelder, U., Christodoulou, V., Vainas, E., Brem, G. Fertilization and embryo recovery rates in superovulated Chios ewe after laparoscopic intrauterine insemination. *Theriogenology* 55, n°9, 1855-1862 (2001).
- Mandiki, S.M.N., Noël, B., Bister, J.L., Perrard, B., Vissher, A., Beerlandt, G., Peeters, R., Kaulfuss, K.H., Suss, R., Paquay, R. Comparison of follicular parameters in different ewe genotypes, carriers or non-carriers of fecundity Boorola or Cambridge gene. *J. Reprod. Fert.* 19, p.173 (1997).
- Martinez, A.G., Furnus, C.C., Matkovic, M., de Matos, D.G. Lambing from transfer of in vivo and in vitro produced fresh or vitrified ovine embryos. *Theriogenology* 42, 579-590 (1997).
- Mc Kelvey, W.A.C., Robinson, J.J., Aitken, R.P., Robertson, I.S. Repeated recoveries of embryos from ewes by laparoscopy. *Theriogenology* 25, 855-865 (1986).
- Mc Millan, W.H., Hall, D.R.H. Laparoscopic transfer of ovine and corvine embryos using the transpic technique. *Theriogenology* 42, 137-146 (1994).
- Mc Neilly, A.S., Fraser, H.M. Effect of GnRH agonist induced suppression of LH and FSH on follicle growth and corpus luteum function in the ewe. *J. Endocrinol.* 115(2), 273-282 (1987).
- Mizumachi, M., Volgmayr, J.K., Washington, D.W., Chen, C.L., Bardin, C.W. Superovulation of ewes immunized against the human recombinant inhibin alpha-subunit associated with increased pré- and post- ovulatory follicle stimulating hormones levels. *Endocrinology* 126 n°2, 1058-1063 (1990).
- Murray, F.A. Embryo Transfer in Large Domestic Mammals? Methods in mammalian reproduction. *Academic Press London*, ISBN: 0-12-201850-8: 285-305 (1978).
- Newcombe, J.R., Martinez, T.A., Peters, A.R. The effect of the GnRH analog, buserelin, on pregnancy rates in horse and pony mares. *Theriogenology* 55 n°8, 1619-1631 (2001).
- Noël, B., Mandiki, S.N.M., Perrard, B., Bister, J.L., Vissher, A., Paquay, R. Terminal follicular growth in Boorola-Texel ewes carriers and non-carriers of the F-gene. *Proceeding of the 13th Int. Congres on animal reproduction* (Stone G.M. and Evans G.) 7, p.20 (1996).
- Perrard, B., Noël, B., Lagache, F., Bister, J.L., Paquay, R. Effects of growth hormone administration on ovarian activity and hormonal secretions during the ovine estrus cycle. *Eur. J. Physiol.* 431 (1996).
- Perrard, N., Lagache, F., Bister, J-L., Paquay, R. Modification of the ovarian follicular population by exogenous Growth Hormone in ewes at different periods of the year. *Pflügers arch. Eur. J. Physiol.* 430, 8-20 (1995).



Racadot, J., Peillon, F., Da Lage, C. Hormones hypothalamo-hypophysaires, Glandes endocrines(3ème édition), p.33 (1972).

Rubianes, E., Menchaca, A. The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats. *Anim Reprod Sci.* 15; 78 (3-4), 271-87 (2003).

Ryan, J.P., Hunton, J.R., Maxwell, W.M.C. Increased production of sheep embryos following superovulation of Merino ewes with a combination of PMSG and FSH-P. *Reprod. Fert. Dev.* 3, 551-560 (1991).

Scaramuzzi, R.S., Adam, N.R., Baird, D.T., Campbell, K., Dowing, J.A., Findlay, J.K., Henderson, K.M., Martin, G.B., McNatty, A.S. A model for follicle selection and determination of ovulation rate in the ewe. *Reprod. Fert. And Dev* (1993).

Schwartz, N.B. Mechanisms controlling ovulation in small mammals. *Handbook of physiology, Endocrinology* (section 7) 2 (female reproductive system, part I), Washington D.C. 60-4587, 145-147 (1973).

Schwartz, N.B., Ely, C.A. Role of gonadotropins in ovulation. Gonadotropins and gonadal function (Moudgal N.R.), *Academic Press London*, ISBN: 0-12-508850-7, 237-252 (1974).

Smits, J., Devroey, P., Braeckmans, P., Camus, M., Wisanto, A., Van Waesberghe, L., Van Steirteghem, A.C. Hormonal changes during combined GnRH-Agonist/hMG therapy in normal and PCO patients. *Abstractbook of the annual Conference 1987 of the Society for the Study of Fertility*. York 6-9 july. Abstract 39, p.35 (1987).

Stringfellow, D.A, Seidel, S.M. Manual of the International Embryo Transfer Society, 2nd edition, Champaign IL, IETS (1990).

Tervit, H.R., Goold, P.G., McKenzie, R.D., Clarkson, D.J. and Drummonds, J. Embryo transfer in Angora and Saanen goats. *New Zealand Veterinary Journal* 31, 67-70 (1984).

Thibault, C., Levasseur, M.C. La reproduction chez les mammifères et l'homme. *Coédition INRA-Ellipse*, Paris, 928 (2001).

Torrès, S. et Sevellec, C. Repeated superovulation and surgical recovery of embryos in the ewe. *Reprod. Nutr. Develop.* 27, 859-863 (1987).

Vallet, J.C., Baril, G., Rougier, F., Chupin, D., Procureur, R., Corteel, J.M. Feasability and repeatability of embryo recoveries from dairy goats under laparoscopy. *3rd Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association*, Lyon, France, 1: 60 (Abstract) (1987).

Walker, S.K., Smith, D.H, Godfrey, B., Scamark, R.F. Time of ovulation in the South Australian Merino ewe following synchronisation of estrus. Variation within and between flocks. *Theriogenology* 31, 545-553 (1989).

Webb, R., Gauld, I.K. Final maturation of the preovulatory follicle in the ewe (Salat-Baroux et Thibaut Ch;), *Masson Paris*, ISBN: 2-225-80221-1, 21-31 (1984).

Zhu, Y.F., Struthers, R.S., Patrick, J., Connors, Jr, Yinghong, G., Gross, T.D., Saunders, J., Wilcoxon, K., Reinhart, G.J., Ling, N., Chen, C. Initial structure-activity relationship studies of a novel series of Pyrrolo [1,2-a] pyrimidin-7-ones as GnRH receptor antagonists. *Bioorganic and medicinal chemistry letters* 12 n°3, 403-406 (2002).